



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina Veterinaria

Unidad de Posgrado

**Análisis y control de un brote de infección con virus de
bronquitis infecciosa aviar en aves vacunadas de una
granja tecnificada de Lima**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencias
Veterinarias con mención en Sanidad Avícola

AUTOR

Jaime Antonio SORIANO PAZOS

ASESOR

Armando GONZÁLEZ

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Soriano J. Análisis y control de un brote de infección con virus de bronquitis infecciosa aviar en aves vacunadas de una granja tecnificada de Lima [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado; 2017.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
Facultad de Medicina Veterinaria
UNIDAD DE POSGRADO



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN CIENCIAS VETERINARIAS CON MENCIÓN EN SANIDAD AVÍCOLA**

En el Auditorio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 15:30 horas del día viernes 31 de marzo de 2017, el Jurado Examinador de Tesis de Grado de Magíster, presidido por el Dr. Raúl Héctor Rosadio Alcántara y constituido por los siguientes miembros: Dr. Armando González Zariquiey (Asesor), Mg. Pablo Reyna Santillán, Mg. Eliana Icochea D'Arrigo, Mg. Néstor Gerardo Falcón Pérez, se dio inicio a la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada:

"Análisis y control de un brote de infección con virus de bronquitis infecciosa aviar en aves vacunadas de una granja tecnificada de Lima", presentado por el Bachiller en Medicina Veterinaria:

JAIME ANTONIO SORIANO PAZOS

Quien sustentó la tesis para obtener el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Sanidad Avícola, absolvió satisfactoriamente las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado y practicada la votación obtuvo la calificación de: **MUY BUENO (18)**

A continuación, el Presidente del Jurado recomendó que la Facultad de Medicina Veterinaria proponga el otorgamiento del Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Sanidad Avícola, al Bachiller en Medicina Veterinaria **JAIME ANTONIO SORIANO PAZOS**.

Siendo las 17:00 horas del día viernes 31 de marzo de 2017, se dio por concluido el acto académico, suscribiéndose la presente Acta.

.....
Dr. Raúl Héctor Rosadio Alcántara (P.P.T.C.)
Presidente

.....
Dr. Armando González Zariquiey (P.P.D.E.)
Miembro (Asesor)

.....
Mg. Néstor Gerardo Falcón Pérez
Miembro (Jurado Externo)

.....
Mg. Eliana Icochea D'Arrigo (P.P.T.C.)
Miembro

.....
Mg. Pablo Reyna Santillán (Profesor Emérito)
Miembro

.....
Dr. César Miguel Gavidia Chugán (P.P.D.E.)
Director de la Unidad de Posgrado
Facultad de Medicina Veterinaria
UNMSM



DEDICATORIA

A Dios

Por la bondad de haberme brindado Fe y salud para cumplir mis objetivos.

A la memoria de mis padres, Olga y Genaro

Por todo su amor y ejemplo de vida.

A mi esposa Techí e hijos, Andrea y Jesús

Por su amor y apoyo incondicional y ser el motor de mi vida.

A mis hermanos Hugo, César, Roberto, Nelly y Elena

Por ser parte importante en mi vida y sus alientos en mi superación.

Jaime

AGRADECIMIENTOS

A mis profesores de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, por su vocación educativa y enseñanzas en mi formación profesional.

A mi asesor, Dr. Armando González, por su valiosa dirección y apoyo en la realización de la presente tesis.

A la Dra. Teresa López de González, por su constante aliento en la culminación de mi tesis.

Al Dr. Aris Malo, por su apoyo en la investigación del presente trabajo.

A la Dra. Eliana Icochea, por sus enseñanzas y motivación en nuestra formación profesional.

A mis amigos, Dres. Ysabel Koga y Robert Tinoco, por su ejemplo de superación personal y profesional.

A mis compañeros Magali Salas, Mercedes Sialer, Mónica Alba, Nancy Moreno, Susana Fribourg, Antonio Cobián, Branko Alva, César Reyes, César Taipe, Elmer Dávila, Francisco Alva, Iván Camargo, Raúl Guillermo, Víctor Rodríguez, Virgilio Pacheco y Xavier Castro-Pozo por todos los momentos que pasamos juntos en la Segunda Especialidad y la Maestría

A todos ustedes mi mayor reconocimiento y gratitud

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS	II
RESUMEN	IV
I. INTRODUCCION	1
II. ACRONIMOS	3
III. REVISION DE LITERATURA	4
1. Generalidades	4
2. Historia de la Bronquitis Infecciosa	4
3. Características del virus de la Bronquitis Infecciosa (IBV)	5
4. Características Morfológicas del IBV	6
<i>Proteínas de replicación</i>	9
<i>Glicoproteínas de espiga (Spike Glycoproteins)</i>	9
<i>Proteínas 3a y 3b</i>	11
<i>Proteínas de envoltura</i>	11
<i>Proteína de nucleocápside</i>	11
<i>Proteínas de membrana</i>	11
5. Mecanismos de transmisión	12
6. Variantes genéticas del IBV	13
7. Patogenie	14
8. Aspectos clínicos	15
9. Aspectos relacionados a la respuesta inmune contra IBV	16
<i>Inmunidad innata</i>	16
<i>Inmunidad celular</i>	17
<i>Inmunidad humoral</i>	18
<i>Inmunidad materna</i>	19
10. Transmisión	20
11. Diagnóstico del IBV	22
<i>Aislamiento Viral</i>	22
<i>Confirmación y tipificación de la cepa usando métodos serológicos</i>	23
<i>Confirmación y genotipificación de cepas usando técnicas moleculares</i>	23
<i>Diagnóstico serológico</i>	24
12. Epidemiología	25
<i>Cepas y serotipos en los últimos años</i>	25

	<i>Control de brotes</i>	33
	<i>Limitaciones para el control del IBV</i>	33
	<i>Clasificación mediante protectotipos</i>	35
	<i>Clasificación mediante serotipos</i>	35
	<i>Clasificación mediante genotipos</i>	36
	<i>Uso de vacunas activas o a virus vivo utilizadas en Perú</i>	37
	<i>Uso de vacunas inactivadas permitidas en Perú</i>	37
IV.	MATERIALES Y METODOS	38
	<i>Granja afectada</i>	38
	<i>Programa sanitario de la granja en estudio</i>	38
	<i>Descripción del brote</i>	39
	<i>Diagnóstico clínico del brote</i>	39
	<i>Diagnóstico y evaluación del brote</i>	40
	<i>Vacunación y desafío</i>	40
	<i>Ensayos de ciliostasis</i>	41
	<i>Tamaño muestral</i>	44
	<i>Análisis de datos</i>	44
	<i>Consideraciones éticas</i>	45
V.	RESULTADOS	46
	<i>Diagnóstico y evaluación del brote</i>	46
	<i>Ensayos de ciliostasis</i>	46
VI.	DISCUSION	48
VII.	CONCLUSIONES	53
VIII.	INDICE ANALITICO	54
IX.	REFERENCIAS	56

RESUMEN

La presente tesis analiza un brote de enfermedad respiratoria compatible con el virus de bronquitis aviar (IBV) en un lote de pollos de carne vacunadas procedentes de una granja comercial ubicada en la zona norte de Lima, Perú. La cepa aislada fue de bronquitis infecciosa y se tipificó como SL04A 0542. El análisis de la secuencia del fragmento de 383 bp del gene S1 demostró una similitud del 91% con la cepa Mass 41. Se concluyó que la cepa del brote no pertenece a las cepas de campo Massachusetts ni a otras comunes en Perú. Se evaluaron diversos programas de vacunación in

vivo utilizando ensayos de ciliostasis y se concluyó que una vacunación de pollos BB de un día de edad con la Cepa Ma5 mas una revacunación a las dos semanas de edad empleando la cepa 4/91 proveían un 100% de porcentaje de protección.

Bronquitis Infecciosa Aviar, análisis de laboratorio, aislamiento viral

ABSTRACT

This thesis analyzes an outbreak of respiratory illness with avian bronchitis virus (IBV) in a lot of vaccinated birds from a commercial farm in the north of Lima, Peru. The isolated virus was infectious bronchitis and was classified as SL04A 0542. Sequence analysis of the 383 bp fragment of the S1 gene demonstrated a 91% with the Mass 41 strain. It was concluded that the outbreak strain did not belong to the strains of Massachusetts and other public field in Peru. Various vaccination programs using in vivo assays ciliostasis and concluded that vaccination of chickens one-day BB-old Strain Ma5 more revaccination at two weeks of age using strain 4/91 They provided 100% were evaluated percent protection.

Avian Infectious Bronchitis virus, laboratory test, virus isolation

I. INTRODUCCION

El concepto de integridad en la salud animal comprende una de las principales determinantes en la eficiencia productiva en la industria aviar. Un incremento en la demanda interna de carne de pollo en el mercado nacional establece un escenario en el cual existe una mayor exigencia productiva en un menor tiempo posible. Es por ello que el avance tecnológico en la generación de líneas genéticas de aves involucra además la implementación de factores de confort para permitirles expresar su potencial genético. Dentro de estos factores, el control de enfermedades infecciosas constituye uno de los principales puntos críticos de control, mediante la implementación de programas de bioseguridad y programas de vacunación. La Bronquitis Infecciosa Aviar (IBV) es una de las enfermedades de mayor impacto en la industria avícola, debido a los costos involucrados en las medidas de control, estrategias de vacunación y a la pérdida de productividad en los lotes infectados.

En el Perú, el IBV constituye un problema en la industria aviar debido a la presencia de factores comunes como por ejemplo deficiencias en el manejo, control de temperatura, humedad, así como fallas en los programas de vacunación. De hecho, el uso de diferentes vacunas vivas atenuadas ha devenido en la aparición de cepas de IBV. Estas variantes antigénicas de IBV han comenzado a emerger en cada uno de los escenarios geográficos, y debido al hecho que no brindan protección cruzada hacen que la vigilancia constante a nivel mundial e identificación de cepas de IBV sea extremadamente importante (Jackwood 2012). Es importante identificar la aparición de estas nuevas cepas de IBV en los plantíos de aves comerciales, ya que esto permitirá reevaluar los programas de vacunación y bioseguridad llevados a cabo en las granjas avícolas, contribuyendo así con la seguridad biológica y evitar la propagación de nuevas variantes antigénicas de IBV en el Perú. Un brote de enfermedad respiratoria fue producido por una variante antigénica de una cepa vacunal y esta observación motivó la presente tesis, que tuvo como objetivos describir y manejar un brote ocasionado por un virus compatible con una variante antigénica de IBV en aves vacunadas de una granja comercial

de Perú para aislar y caracterizar la cepa de IBV. Asimismo, evaluó diferentes programas de vacunación para controlar el brote usando ensayos de ciliostasis.

El brote de IBV observado en la zona norte de Lima permitió describir características clínicas en las aves afectadas asociándola con posibles factores desencadenantes. Además, permitió utilizar herramientas moleculares para identificar y caracterizar la cepa patogénica productora del brote y evaluar diferentes programas de vacunaciones para el control de la cepa identificada.

II. ACRONIMOS

BI: Bronquitis infecciosa (la enfermedad)

EUA: Estados Unidos de América

ELISA: Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas)

IBV: Virus de Bronquitis Infecciosa

IF: Inmuno Fluorescencia

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

RNA: Ácido Ribonucleico

RT-PCR: Transcripción Reversa - PCR

UK: Reino Unido

III. REVISION DE LITERATURA

1. Generalidades

La familia Coronaviridae agrupa a los virus que causan una variedad de enfermedades desde bronquitis a gastroenteritis, hepatitis, peritonitis, nefritis y encefalitis (Pratelli 2006). El virus de Bronquitis Infecciosa Aviar (Infectious Bronchitis Virus; IBV) es un miembro del género Coronavirus, familia Coronaviridae y del orden Nidoviridales. Es un virus con envoltura, RNA⁺ de cadena simple. Este virus ocasiona una enfermedad altamente contagiosa y de gran impacto económico en producción avícola, debido a que tiene la capacidad de afectar el tracto respiratorio y reproductivo, y algunas cepas se han asociado a cuadros de nefritis, ocasionando por lo tanto

cuantiosas pérdidas económicas para los productores (Jackwood 2012). Dentro del sistema de clasificación, IBV es un Coronavirus de tipo 3, conjuntamente con otras especies en patos y faisanes (mientras que los Coronavirus de mamíferos están incluidos en los tipos 1, 2 y 4) (Ignjatovic and Sapats 2000). La bronquitis infecciosa aviar es una enfermedad viral, producida por el IBV, es aguda y altamente contagiosa que afecta únicamente a las aves gallináceas (Jackwood 2012). Pese a estar descrita desde los 20's, sigue siendo una de las principales causas de pérdidas económicas para la industria aviar a nivel mundial (Ignjatovic and Sapats 2000). Las principales vías de transmisión son los aerosoles o el contacto con heces de animales infectados (Cavanagh 2007).

2. Historia de la Bronquitis Infecciosa Aviar

La Bronquitis Infecciosa (BI) es una enfermedad altamente contagiosa de importancia económica para la industria aviar. El primer reporte de BI se hizo describiendo un brote sumamente contagioso de una enfermedad en pollos bebe con síntomas respiratorios en 1931, en Dakota del Norte (Schalk and Hawn 1931). Los hallazgos post-mortem incluían congestión y exudado mucoso en bronquios y tráquea. La enfermedad demostró ser rápidamente transmisible mediante exposición o transferencia de exudado bronquial. Sin embargo, la naturaleza infecciosa de la enfermedad no fue demostrada, lo que favoreció su distribución en diferentes partes de los EUA hasta que posteriormente fue diagnosticada (Fabricant 1998). Como las alteraciones en el tracto respiratorio alto de las aves afectadas durante el primer brote eran prominentes, a la enfermedad se le denominó “bronquitis infecciosa de los pollitos jóvenes”.

Cinco años más tarde, se demostró que el agente causal del brote fue un virus, que pasó a denominarse el virus de la bronquitis infecciosa (IBV) (Beach and Schalm 1936). Luego de las primeras descripciones se reportaron varios casos en los Estados Unidos (Hitchner y col., 1966; Johanson y col., 1973; Jungherr y col., 1956) y en el mundo (de Wit y col., 2013; Jackwood y col., 1997). Algunos aspectos de mayor importancia relacionados a IBV incluyen el establecimiento de la

etiología viral de la enfermedad por Beach & Schalm (Beach and Schalm 1936), el primer cultivo del virus en huevos embrionados por Beaudette & Houston (Beaudette and Hudson 1937) y el reporte de Jungherr (Jungherr y col., 1956) quienes indicaron que las cepas Connecticut y Massachusetts ocasionaban un cuadro clínico similar; pero, no producían protección cruzada (Cavanagh 2007).

3. Características del virus de la Bronquitis Infecciosa (IBV)

La bronquitis infecciosa (BI) es causada por el virus de la bronquitis infecciosa (IBV), un miembro del género Coronavirus y de la familia Coronaviridae y la orden Nidovirales (Enjuanes y col., 2000; Lai and Cavanagh 1997). El RNA genómico de los Coronavirus es el más grande entre los virus RNA. Las partículas virales presentan pleomorfismo, aunque predominan las formas redondeadas y un tamaño de 90-200 nm (Parthasarathy y col., 2012). El VBI tiene un genoma constituido por alrededor de 27.500 nucleótidos dispuestos en una hebra simple no segmentada, que contiene información codificada para la síntesis de proteínas funcionales y estructurales (Zhang y col., 2010; Zhou y col., 2014). Este material está rodeado por una envoltura lipídica (Brian and Baric 2005) que presenta la inserción de proyecciones en forma de bastones o mazos, que son estructuras proteicas y que una microfotografía electrónica le da la apariencia de una corona (Cavanagh 2005).

Los coronavirus afectan una gran variedad de animales en los que producen cuadros respiratorios, entéricos, hepáticos de diversa severidad (Enjuanes y col., 2000; Lai and Cavanagh 1997). El Comité internacional de taxonomía de coronavirus clasificó a los coronavirus en tres grandes grupos basados en su características genéticas y fenotípicas: alphacoronavirus (anteriormente grupo 1), betacoronavirus (anteriormente grupo 2) y gammacoronavirus (anteriormente grupo 3). Los coronavirus aviáres, que incluyen el IBV pertenecen al grupo de los gammacoronavirus (Lau y col., 2013; Lau y col., 2012a; Lau y col., 2012b; Woo y col., 2012).

4. Características Morfológicas del IBV

Al igual que todos los miembros de la familia Coronaviridae, su denominación se debe a las proyecciones pedunculadas (espículas) que cubren la envoltura del virión, dándole un aspecto de corona solar (Ver figura 1). Estas proyecciones corresponden a peplómeros de 20 nm de longitud. El virión de Coronavirus es un aparato diseñado para transportar una gran molécula correspondiente al genoma viral, una cadena simple de ácido ribonucleico (ARN) de sentido positivo, con una longitud de 27,3 a 31,3 kb (Beiras 2010; Liu y col., 2005). La figura 1 presenta un esquema de bronquitis aviar.

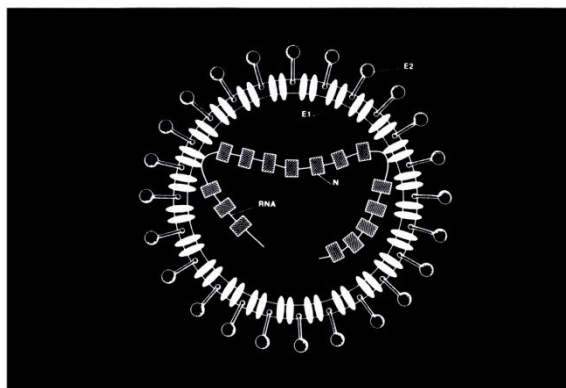


Figura 1. Representación esquemática del virus de bronquitis infecciosa

La composición de polipéptidos de varios coronavirus fue determinado el siglo pasado. Entre ellos la cepa de coronavirus humano (HCV) cepa OC43 (Hierholzer y col., 1972); la gastroenteritis transmisible de los cerdos (Garwes and Pocock 1975; Garwes y col., 1976) y el virus de la encefalitis hemaglutinante del cerdo (Pocock and Garwes 1977). En general, los polipéptidos de estos coronavirus se clasifican en por tamaños y glicosilación (STURMAN). Hay polipéptidos glicosilados de pesos moleculares entre 130×10^3 a 200×10^3 y polipéptidos entre 89×10^3 a 125×10^3 . Los polipéptidos de ambas clases están glicosilados y constituyen las espículas virales, o proteína S. Los polipéptidos no glicosilados pesan entre 50×10^3 a 60×10^3 y forman el tercer grupo de polipéptidos, aquellos que conforman la nucleocápside (N). El cuarto grupo de polipéptidos pesa entre 18×10^3 a 30×10^3 . Al menos uno de los polipéptidos de este grupo esta glicosilado (Sturman y col., 1980).

IBV presentan tres proteínas de mayor importancia: Los peplómeros o espículas (S) que son glicoproteínas localizadas en la superficie del virión y consisten en dos subunidades denominadas S1 y S2; las proteínas de membrana (M) que se encuentran parcialmente expuestas en la superficie del virión y las proteínas de la nucleocápside (N) que se encuentran localizadas internamente (Ignjatovic and Sapats 2000). Se pueden discernir 12 polipéptidos cuando se analiza la proteína S del VBI empleando electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (Cavanagh 1981; Cavanagh 1983; Cavanagh 1984). El VBI presenta 3 proteínas estructurales. Dos de ellas son glico-proteínas y están integradas o relacionadas con la envoltura o membrana del virión: (1) proteína S que forma las proyecciones o espículas, (2) proteína M, un polipéptido más pequeño, mayormente integradas a la envoltura del virus ya que solo el 10% de los aminoácidos (aa) emergen a la superficie, (3) la tercera

es una proteína no glicosilada (N) que está íntimamente asociada al RNA viral constituyendo la ribonucleoproteína (RNP).

Proteínas de replicación

Dos tercios del genoma de IBV consisten en regiones ORF1a y ORF1b las cuales codifican para proteínas 1a y 1b respectivamente, que posteriormente contribuyen a la formación del complejo de replicación y transcripción (Imbert y col., 2008). Estas proteínas posteriormente generarán 15 proteínas no estructurales (Nsp2-16) que comprenden una proteasa principal denominada proteasa 3C-like, una proteasa Papain-like, una ARN polimerasa ARN-dependiente (RdRp) y otras proteínas no estructurales (van Hemert y col., 2008).

Glicoproteínas de espiga (Spike Glycoproteins)

La Glicoproteína de espiga (proteína S) de los Coronavirus contiene cuatro dominios involucrados en el anclaje de la proteína en la membrana lipídica del virión. El gen que codifica para la proteína S consiste en 1162 aminoácidos (Figura 2) y es escindido en dos subunidades, la subunidad S1 N-terminal (535 aminoácidos) y la subunidad S2 C-terminal (627 aminoácidos). La subunidad S1 contiene los determinantes de virus neutralización y especificidad antigénica que son responsables de la unión a la célula hospedadora, neutralización y respuesta inmune (Ignjatovic and Galli 1994; Koch y col., 1990; Schultze y col., 1993). Variaciones en la secuencia de nucleótidos de la región S1 pueden conllevar a un pobre nivel de protección entre serotipos. La alta variación en la secuencia de nucleótidos la habilidad protectora de una vacuna (Cavanagh and Gelb 2013; Cavanagh 2003a). De otro lado, la región S2 está involucrada en la oligomerización y entrada de la proteína en la célula hospedadora (Guo y col., 2009; Tripet y col., 2004).

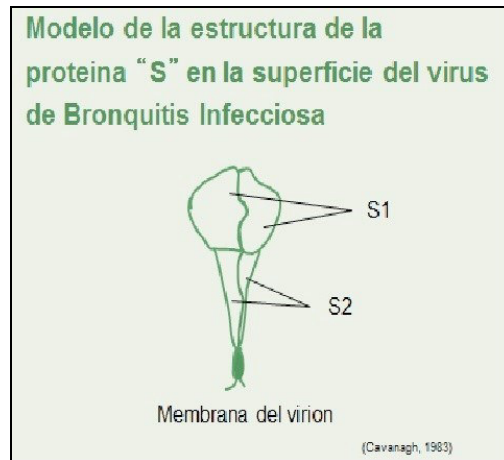


Figura 2. Proteína S

Proteínas 3a y 3b

Estas proteínas se codifican en el gen 3 que contiene dos marcos de lectura abierta (ORF 3a y ORF 3b) que codifican para las proteínas 3a y 3b (De Vries y col., 1977), las cuales han demostrado actividad tricistrónica. Tanto ORF3a y ORF3b contienen secuencias de nucleótidos altamente conservadas (Mo y col., 2012).

Proteínas de envoltura

Las proteínas de membrana (proteínas E) son un grupo de pequeñas proteínas de membrana integrales asociadas a la envoltura del virión (Smith y col., 1990). Es un componente de gran importancia durante el ensamblaje del virión, ya que mutaciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína E afecta la capacidad de ensamblaje viral en las células (Fischer y col., 1998).

Proteína de nucleocápside

La proteína de Nucleocápside (proteína N) está constituida por 282-455 aa que se asocian al RNA en toda su extensión encapsulando al material genético, protegiéndolo y facilitando su incorporación al virión en el momento del ensamble (síntesis viral). Este tipo de proteínas están involucrados en gran variedad de funciones como empaquetamiento y ensamblaje viral, señalización celular y modulación de los procesos celulares (Hogue 1995). Forma la RNP, de estructura helicoidal y está implicada en los procesos de replicación del RNA. Aunque anticuerpos contra la RNP son los primeros en aparecer después de la infección de VBI, éstos parecen no ser protectivos (Cavanagh and Gelb 2013).

Proteínas de membrana

Las proteínas M interactúan con otros componentes estructurales para la organización y ensamblaje de las partículas virales (Hogue 2008). La porción más larga de la proteína integral de membrana (M) se encuentra embebida dentro de la bicapa lipídica y mantienen la integridad estructural (Godet y col., 1992). La glicoproteína M, la más pequeña, es un polipéptido de 225 aa (Aminoácidos), la mayor parte de ellos incorporados a la membrana o envoltura del virus. Sólo 20 aa se exponen sobre la superficie de la envoltura (Garwes and Pocock 1975). La presencia de proteína M en la célula infectada es necesaria para la maduración del virus y ella determina el lugar del ensamblaje de la partícula viral (You y col., 2007).

5. Mecanismos de transmisión

El virus IBV es un patógeno altamente infeccioso. Las aves infectadas desarrollan signos clínicos muy rápidamente, usualmente en las primeras 36 a 48 horas. El virus se replica primariamente en el tracto respiratorio alto, llevando a viremia y luego se dispersa en otros órganos (Raj and Jones 1997b). Usualmente el virus se presenta en altas concentraciones en tracto respiratorio alto durante los primeros 3 a 5 días de infección (Cook 1968a; El-Houadfi y col., 1986). En general, se puede detectar una gran cantidad de virus en la mucosa traqueal y en las heces durante la etapa aguda y las fases de recuperación de la enfermedad. En algunos casos, el IBV persiste como infección latente y

las aves continúan excretando partículas virales por las heces. El virus se transmite horizontalmente por alimentos o agua contaminada. Los utensilios usados en las granjas son una fuente de contaminación mayor, así como los trabajadores y los camiones que entran y salen de las granjas contaminadas (Ignjatovic and Sapats 2000). Las aves silvestres pueden jugar un papel crucial como reservorios y vectores del IBV (Chen y col., 2014; Hughes y col., 2009).

La Bronquitis infecciosa aviar es una enfermedad extremadamente difícil de controlar debido a la presencia de múltiples serotipos y variantes del virus que han emergido y que no brindan reacción cruzada. En muchos escenarios geográficos, múltiples variantes antigénicas pueden estar presentes, lo que propone la aplicación de vacunas múltiples para su control. A pesar de que muchas regiones en el mundo comparten tipos antigénicos comunes, la aparición de cepas antigénicas con distribución geográfica única existen, por ejemplo en Europa, Estados Unidos de América (USA) y Australia (Jackwood 2012).

6. Variantes genéticas del IBV

Existen variantes genéticas del virus de IBV a nivel mundial, siendo algunas de éstas variantes ubicuas en determinada área geográfica, mientras que otras se encuentran más dispersas. La razón por la cual algunas cepas se distribuyen más rápidamente es desconocida (de Witt and van der Heijden 2010). Por ejemplo, variantes de gran importancia a nivel mundial como son 4/91 y QX, las cuales están presentes en Europa, Asia y África, no han sido reportadas en Estados Unidos y Australia. Por otro lado, la variante Arkansas, una de las más importantes en los EUA también ha sido reportado en otros países. Adicionalmente un estudio indicó que la aparición de nuevas variantes de IBV en otras especies de aves como palomas, patos y gansos jugarían un rol de gran importancia en la diseminación del virus a nivel mundial (Cavanagh 2005).

Fuerzas genéticas como las mutaciones, recombinaciones y presión selectiva juegan un rol significativo en la evolución del genoma viral (Zhang y col., 2006). Cuando los virus circulan en

ambientes contra los que las aves desarrollan protección por exposiciones previas y vacuna, los anticuerpos de la población funcionan como un factor de selección. Vale decir, si el virus es el mismo, los anticuerpos de la población van a prevenir su replicación. Empero, el IBV muta naturalmente y estas mutaciones pueden cambiar ligeramente los epítomos de forma tal que los anticuerpos devenidos de exposiciones previas ya no pueden evitar la multiplicación del virus. A ese fenómeno de variación ligera para prevenir los anticuerpos de exposiciones previas se le llama “deriva antigénica”, del inglés “antigenic drift”.

De otro lado, el virus puede cambiar toda la proteína de espiga por recombinación, evadiendo cualquier protección por exposición previa o vacuna. El fenómeno de recombinación ocurre cuando dos o más virus infectan a la misma célula, dentro del cual se cree que ocurren eventos de recombinación entre las secuencias genómicas de los virus (Makino, Fleming et al. 1987). Dado que los virus ARN tienen un mecanismo único de elección de copias durante la fase de activada de la polimerasa, se dan las condiciones para una alta tasa de recombinación. De hecho, la recombinación sumada a la alta tasa de corrección de errores de la polimerasa viral serían los responsables de los eventos que conllevan a alteraciones en el tropismo tisular (Graham & Baric, 2010). En el caso de los Coronavirus se sabe que las mutaciones y la presión selectiva de genes, principalmente a nivel de las regiones hipervariables facilitarían a los virus cruzar la barrera de especies y poder cubrir un mayor rango de hospedadores, contribuyendo con la evolución viral (Zhang y col., 2006).

Se ha postulado que el virus de VBI sufre variaciones genéticas durante la invasión al huésped, es decir, el genotipo/fenotipo dominante sufre cambios durante la invasión en el huésped de acuerdo a la forma como el microambiente de los diferentes tejidos ejerce una presión selectiva sobre la población de virus que se está replicando (Cavanagh y col., 2005; Jackwood 2012).

7. Patogenicie

La Bronquitis Infecciosa (BI) es una enfermedad altamente contagiosa de las gallinas, provocada por un Coronavirus, que se puede presentar como: (1) una entidad respiratoria, a veces

complicada con una infección bacteriana secundaria que puede terminar en una colisepticemia con alta morbilidad y mortalidad variable (Smith y col., 1985). (2) un trastorno productivo de gallinas adultas con alteraciones en la producción de huevos de consumo y fértiles, y con deterioro de la calidad externa (cáscara) o interna (albúmina) de éstos. (3) un síndrome nefritis/nefrosis que determina una insuficiencia renal y/o urolitiasis. En numerosas ocasiones la BI se puede presentar como una combinación de estas diferentes formas.

La patogénesis comienza como una infección del tracto respiratorio alto con un período de incubación muy corto, ya que a las 24 a 48 horas el virus de BI (VBI) induce la presentación de signos clínicos como: estertores traqueales y exudado nasal (Cook 1968b). Después de la invasión del epitelio traqueal el VBI provoca una viremia diseminándose a órganos o tejidos como los riñones y ovario / oviducto donde puede provocar lesiones por un tiempo prolongado con una disminución de la producción de huevos; presencia de huevos deformes, cáscara rugosa, adelgazada o quebradiza y finalmente huevos sin cáscara. También puede haber una alteración de la albúmina que se hace más líquida (Cook 1968b).

Aunque la BI con alteraciones respiratorias y reproductivas es una enfermedad de alta morbilidad, y nula o escasa mortalidad, ésta última puede ser muy importante cuando se presenta como patología renal. Pollos broilers y pollas de reposición han presentado mortalidad entre 4 y 14% durante brotes de BI por cepas nefropatogénicas. Estas mismas cepas han dado origen a una prolongada mortalidad de gallinas ponedoras por nefritis-nefrosis y urolitiasis, que acumulada durante el período productivo puede llegar a ser de 10 a 22%.

8. Aspectos clínicos

Los síntomas clínicos se asocian al sistemas respiratorio, reproductivo, digestivo y renal en aves domésticas (Cavanagh 2007) y otras aves (Cavanagh 2005). La enfermedad produce tos, estornudos, ronquera, pérdida de peso, descargas nasales, pérdida de apetito, reducción de conversión alimenticia, hinchazón de senos, disminución de consumo de agua, diarrea, depresión, letargia y

crecimiento pobre en broilers. En ponedoras produce “síndrome de falsa postura”, afectando la calidad de la cascara del huevo (cascara delgada, rugosa, frágil y de clara acuosa) y produce un decrecimiento de la producción. En algunos casos, el virus puede producir daños severos al oviducto y devenir en una pérdida permanente de la producción (Cavanagh and Gelb 2013; Cavanagh 2003b; Cook y col., 1990; Fabricant 1998; Otsuki y col., 1990).

La BI puede alcanzar una mortalidad del 20-30% o mayor en aves de 5 a 6 semanas de edad (Ignjatovic and Sapats 2000; Seifi y col., 2010). La mortalidad se puede incrementar debido a la inmunosupresión, micoplasma y otras infecciones bacterianas producidas por agentes infecciosos oportunistas como *Escherichia coli* (Dwars y col., 2009), *Ornithobacterium rhinotracheale* y *Bordetella avium* (Cavanagh and Gelb 2013; Hopkins and Yoder, Jr. 1984; Matthijs y col., 2003). La tasa de mortalidad puede ser tan baja como 1% y los pollos se pueden recuperar rápidamente si la infección se produce por cepas poco virulentas y no se asocian con infecciones bacterianas secundarias (Cavanagh and Gelb 2013).

9. Aspectos relacionados a la respuesta inmune contra IBV

Una de las principales características de la infección con Coronavirus es su versatilidad; por lo tanto, diferentes poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ pueden verse afectados en diferentes modelos. Tanto la respuesta humoral como la respuesta mediada por células son de gran importancia para el control de las infecciones, mientras que la inmunidad innata es crucial para el control de IBV en infecciones en campo (Caron 2010). Se ha demostrado el efecto protector de los anticuerpos a nivel de tejidos como los oviductos. Los estudios de vacunación además se han enfocado en la inmunidad humoral en relación a la protección. Sin embargo, los estudios también han indicado que, si bien los anticuerpos juegan un rol importante en el proceso de cura, otros mecanismos inmunológicos están involucrados.

Inmunidad innata

Nuevos estudios han indicado el rol de la respuesta inmune innata en IBV. Tradicionalmente, la importancia de la inmunidad innata se limitaba a las primeras fases de la invasión microbiana, pues limitaba la dispersión del patógeno hasta que las respuestas humoral y/o celular se instalaban (Jackwood and de Witt 2013). Luego de la infección del epitelio traqueal se da inicio a la transcripción seleccionada de genes de la respuesta inmune innata como TLR3, TLR7, IL-1 β e INF- β , así como un reclutamiento de macrófagos con una posterior disminución en la expresión de estos genes, lo que finalmente lleva a una acumulación del material viral y los cambios histopatológicos consecuentes (Kameka y col., 2014). Por otro lado, Wang (Wang y col., 2006) mediante un estudio de infección experimental en pollos con cepas atenuadas de IBV-Mass encontraron que durante la infección inicial ocurre la estimulación e inhibición de diversos genes relacionados. Entre los genes estimulados se encontraron TLR2, TLR3, Interferones y genes responsables de actividad citotóxica (FAS y Granzima A), lo que demuestra su papel en la defensa del hospedador contra IBV y el aclaramiento viral (desaparición del antígeno viral en un ave previamente positiva para el antígeno viral), luego de la infección local. Existe además resistencia genética contra IBV, como fue demostrado por Banat (Banat y col., 2013) quienes demostraron mayor resistencia contra infecciones de virus IBV en líneas heterocigotes de haplotipos B del MHC (B2/B12) en comparación con líneas homocigotes (B12, B19). Estos hallazgos sugieren que los determinantes genéticos en haplotipos B definidos pueden ser explotados para generar mayor respuesta contra patógenos respiratorios.

Los heterófilos constituyen la primera línea de defensa contra los agentes virales y son los primeros en llegar al foco primario de infección. En aves infectadas con IBV, son el tipo celular más numeroso durante infecciones iniciales, a pesar de ello los heterófilos no tienen efecto alguno contra la multiplicación viral, y en lugar de ello contribuyen al daño tisular en el epitelio traqueal (Raj and Jones 1997b). Por otro lado, el rol de los macrófagos en las fases tempranas de infección es desconocido, mientras que la actividad de las células NK no se ve alterada durante la infección (Wakenell y col., 1995).

Inmunidad Celular

La evidencia de la inmunidad mediada por células contra IBV ha sido analizada mediante pruebas de transformación de linfocitos, actividad citotóxica de linfocitos, actividad de células naturales y evidencia histológica de la infiltración de determinado perfil de linfocitos T (Calnek 2002). El primer reporte del posible rol de la inmunidad mediada por células hacia el virus de IBV fue realizada por Timms (Timms and Bracewell 1981; Timms and Bracewell 1983; Timms y col., 1980). En dichos estudios se demostró proliferación de linfocitos T antígeno-específicos en aves infectadas con IBV. La única citoquina estudiada en relación a IBV era el Interferón gamma (INF- γ); sin embargo, poca importancia se dio, hasta que posteriormente se asoció éste componente a un retraso en el inicio de la infección con IBV y en la severidad de la infección. Trabajos que empleaban coloración nefropatogénica gris demostró que la respuesta limitada del Complejo Mayor de Histocompatibilidad I (MHC-I) correlacionaba mejor que la inmunidad humoral con la eliminación inicial del virus de los pulmones y riñones durante la fase aguda de la enfermedad (Jackwood and de Witt 2013).

En relación a la inmunidad de memoria desarrollada en infecciones con IBV, estudios previos han demostrado el rol de los linfocitos T CD8(+) para controlar la infección aguda, demostrándose además que las células CD8(+) de memoria y no las células CD4(+) son cruciales en el control de la enfermedad (Pei y col., 2003). Estos resultados demuestran que las células T de memoria CD8+ específicas generadas a las 6 a 8 semanas post-infección pueden proteger contra infecciones agudas por IBV en animales vacunados. Además, los estudios de protección experimental han demostrado que luego de la transferencia pasiva de linfocitos T CD8+ se produjo un efecto protector contra futuros desafíos virales. Estos resultados confirman por lo tanto que los linfocitos T $\alpha\beta$ que albergan antígenos CD8(+) son cruciales en la protección contra IBV (Seo y col., 2000).

Inmunidad humoral

Se ha demostrado que los pollos desarrollan una buena respuesta serológica contra IBV, lo cual ha sido utilizado para la elaboración de diferentes pruebas diagnósticas como la Inmuno Absorbancia Ligada a Enzima (ELISA) o Inhibición de la Hemaglutinación (IH). No obstante, existe una baja correlación entre los títulos de anticuerpos y la resistencia a la infección, aunque se cree que la inmunidad de mucosa juega un papel importante en la protección del tracto respiratorio (Ignjatovic and Galli 1994; Raggi and Lee 1957; Raggi and Lee 1965).

La región S1 de la glicoproteína de espiga estimula la formación de anticuerpos neutralizantes (mediante ensayos de Virus Neutralización e Inhibición de la Hemaglutinación) y ha sido considerado como el más grande inductor de protección (Ignjatovic and Galli 1994); no obstante otras regiones de la proteína S como S2 y la proteína M son importantes ya que ellos portan epítopes inductores de anticuerpos de reacción cruzada (Ignjatovic and Galli 1993). Los anticuerpos específicos contra IBV provienen a partir del desarrollo del virus por viremia a partir de la tráquea a otros órganos (incluyendo a nódulos linfoides). El primer isotipo, IgM, está presente de forma transitoria inmediatamente después de la infección y su diagnóstico indica la presencia de infecciones recientes, mientras que la IgG es la de mayor circulación y de mayor sensibilidad para el diagnóstico.

Los ensayos de vacunación han demostrado que luego de la inmunización con una cepa vacunal existe un incremento inicial en la concentración de IgM, la cual alcanza un pico y luego declina para posteriormente incrementarse los niveles de IgG (Martins y col., 1991; Martins y col., 1992), los cuales pueden ser detectados desde el día 4 hasta los 21 días post-infección y mantener niveles altos por varias semanas. Durante posteriores desafíos en aves vacunadas el pico de producción de IgM ocurrirá al mismo tiempo que el de IgG, aunque declinará más rápido (Jackwood 2012). A pesar que varios estudios que han detectado anticuerpos neutralizantes, la relevancia de los anticuerpos en los mecanismos de protección contra la enfermedad todavía son desconocidos (Jackwood and de Witt 2013). La importancia de las células linfocitarias B en infecciones con IBV ha

sido demostrada experimentalmente. Los resultados de animales bursectomizados o tratados con ciclofosfamida indicaron mayor grado de lesiones y cambios histopatológicos en los riñones, asociados a la prolongada persistencia del virus (Raj and Jones 1997a). Es probable que los anticuerpos neutralizantes específicos a IBV previenen la diseminación durante la viremia desde la tráquea a otros órganos como oviductos y riñones (Raj and Jones 1997a). Por otro lado, los anticuerpos maternos pueden proporcionar protección contra IBV, pero por un período de tiempo corto (Cook y col., 1991) y no tienen efectos adversos sobre la eficacia de las vacunas vivas administradas al día de edad (Davelaar and Kouwenhoven 1977).

Inmunidad materna

Niveles altos de anticuerpos maternos reducen significativamente los síntomas clínicos o el daño debido al virus en tráquea, riñones durante los primeros días de vida (de Wit y col., 2011).

Varios grupos han reportado un efecto negativo de niveles altos de anticuerpos maternos contra las cepas vacunales cuando se aplican el día del nacimiento, mientras que otros no han detectado una menor eficacia en pollitos vacunados al día de edad en presencia de anticuerpos maternos (Jackwood and de Witt 2013).

10. Transmisión

La principal ruta de transmisión del virus de IBV ocurre a nivel del tracto respiratorio, probablemente mediante aerosoles (Siddell, 2010). Durante la fase clínica de la enfermedad (aproximadamente 28 días post-infección), el virus es obtenido intermitentemente a partir del tracto respiratorio. No obstante, una vez alcanzado el cuadro clínico, el virus de IBV replica en gran variedad de tejidos y luego que las aves se recuperan, las mejores tasas de eliminación viral se obtienen en las heces, sugiriendo que el tracto intestinal y las tonsilas son probablemente reservorios del virus. Por lo tanto, la infección respiratoria constituye el mejor método de transmisión, aunque la ingestión del virus vía agua o alimento contaminado juega también un rol importante en la transmisión (Cook and Mockett 1995).

Aunque los mecanismos de transmisión lateral constituyen la principal ruta de transmisión se ha demostrado que el virus además puede ser recuperado de huevos de gallinas infectadas experimentalmente (hasta las 6 semanas post-infección) (Cook and Mockett 1995). Un hallazgo interesante demostró además que el virus de IBV puede ser obtenido a partir de muestras de semen de gallos infectados hasta por 14 días luego de la inoculación y que podría tener implicancias sobre las rutas de transmisión del virus (Gallardo y col., 2011).

Las diferencias entre serotipos del VBI radican en algunas secuencias de pocos aa específicos (epítomos) anidados en ciertas regiones de la proteína S, especialmente en -SI. Por lo tanto, anticuerpos específicos contra estos epítomos virales neutralizan a sus cepas homólogas, pero no aquellas que son heterólogas explicando los diferentes serotipos y variantes. Existen muchos tipos antigénicos de VBI, por ejemplo, las cepas Massachusetts D274, 293B y B1648. La cepa Massachusetts se aisló por primera vez en Europa en la década de los 1940 (Cavanagh y col., 1992; Cavanagh and Davis 2014). El tipo D274 fue el tipo más comúnmente aislado en varios países de Europa occidental a principios de los 1980s

La estrategia utilizada por el IBV para adaptarse a su medio ambiente fue revelada en 1956, cuando Jungherr y col (Jungherr y col., 1956) demostraron diferencias antigénicas entre virus aislados de Massachusetts y de Connecticut. Desde entonces, numerosos estudios convencionales y de epidemiología molecular han confirmado la habilidad de los IBV de evolucionar rápidamente evitando el efecto de los programas de vacunación implementados para su control desde 1950. La evolución de los IBV se ha explicado por mutación genética de los epítomos de la proteína S1 como si la evolución estuviera mediada por la presencia de anticuerpos contra esta proteína en la población de aves. Los mecanismos que regulan la evolución de los IBV incluyen a las dos posibilidades, la generación de diversidad genética y el proceso de selección durante la infección mediado por los anticuerpos contra la proteína S1. La generación de variación involucra mutaciones y eventos de recombinación que ocurren durante un ciclo de reproducción viral. La relevancia del proceso de selección se ha entendido

recientemente identificando diferencias genéticas y fenotípicas entre poblaciones de virus de IBV antes, durante y después de la replicación viral en el hospedero natural. La evidencia sugiere que múltiples fuerzas ambientales dentro del hospedador, incluyendo respuesta inmune (o carencia de ella) y la afinidad por receptores celulares, así como condiciones físicas y bioquímicas son responsables por el proceso de selección. Continuas modificaciones antigénicas en estas regiones de la proteína S explican la incapacidad de las vacunas para controlar algunos brotes de BI. En último término variaciones ocurridas en genes que codifican esa proteína, responsable de la fijación del VBI a la célula huésped, son las que generan nuevas cepas que escapan a la protección que confieren las vacunas (Toro y col., 2012).

Como se expuso anteriormente, se podría especular que estas cepas variantes se originaron naturalmente de un ancestro común y evolucionaron independientemente en condiciones de campo bajo la presión selectiva de anticuerpos neutralizantes (deriva antigénica). La sustitución de muy pocos aminoácidos puede ser suficiente para provocar diferencias serológicas grandes. Las cepas europeas D207, D274. UK/6/8 y UK/ 142/86, agrupadas en el serotipo B: la cepa UK/167/84 que conforma el serotipo F: y las cepas D3896 y DU/ 123/82 agrupadas en el serotipo E demostraron tener una secuencia de aa muy similar en S 1. Las diferencias más extremas entre 2 cepas fueron 23 aa. de los 520 que forman estos polipéptidos y se concentraron en 3 sitios antigénicos. La cepa holandesa D207 del VBI presenta epítomos para anticuerpos monoclonales en 8 regiones de la secuencia de aminoácidos de la proteína S. En S 1 se localizan 6 sitios antigénicos (epítomos) y 2 sitios en S2. Variantes de la cepa D207 que no son neutralizadas con los anticuerpos monoclonales anteriormente descritos, muestran sustitución de la aa originales en 5 de las 8 regiones antigénicas (Jackwood 2012).

11. Diagnóstico del IBV

El diagnóstico de IBV se basa en la historia clínica, las lesiones anatómo-patológicas, la seroconversión (aumento de títulos de anticuerpos), detección de antígeno viral, aislamiento de virus

y detección de RNA viral (Jackwood and de Witt 2013). Los órganos de elección para el aislamiento viral son obtenidos de órganos como tráquea, pulmones y riñones; órganos como hígado y páncreas son candidatos para la detección de antígenos; mientras que la tráquea y el bazo son elegidos para el diagnóstico histológico (Fan y col., 2012).

Aislamiento Viral

Para el aislamiento del virus de IBV el tejido principal es la tráquea, no obstante en algunos casos las tonsilas cecales presentan una gran carga viral principalmente en infecciones mayores a una semana (Calnek 2002). Esto es debido a que el virus se depura más rápido en la tráquea que en otros tejidos (Jackwood and de Witt 2013). Dependiendo de la cepa viral involucrada, otros tejidos pueden ser remitidos para el aislamiento viral como por ejemplo pulmones, riñones y oviductos si los especímenes para el aislamiento viral se colectan después de una semana de iniciada la enfermedad (Jackwood and de Witt 2013).

El aislamiento viral suele ser un método laborioso, debido a que se requieren varios pasajes en huevos embrionados o cultivos celulares hasta poder aislar el material viral. No obstante, este método es actualmente reemplazado por la combinación de pasajes en embriones y técnicas secundarias, entre las cuales están la Inmunofluorescencia (IF), Inmuno Ensayo de Absorbancia ligado en Enzima (ELISA) o Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (de Witt 2000).

Confirmación y tipificación de la cepa usando métodos serológicos

Se puede confirmar la detección del virus de IBV directamente en especímenes colectados en la necropsia o de virus cultivado en huevos embrionados por Inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa utilizando anticuerpos monoclonales o policlonales. Sin embargo, los resultados podrían ser de difícil interpretación, especialmente si se trabaja con especímenes de campo debido a reacciones no específicas. El serotipo de los virus se puede determinar empleando virus neutralización o inhibición de la hemaglutinación. La virus-neutralización, sea que se emplea usando huevos embrionados o cultivo de tejidos toma tiempo y requiere personal capacitado. El uso de las pruebas de inhibición de

hemaglutinación suele ser limitada debido a las reacciones cruzadas. De hecho, la serotipificación ha sido desplazada por la genotipificación (Jackwood and de Witt 2013).

Confirmación y genotipificación de cepas usando técnicas moleculares

En la actualidad varios ensayos de real-time RT-PCR han sido utilizados en laboratorios de Medicina Veterinaria para el diagnóstico de una gran variedad de agentes patógenos (Belak 2007). Entre los más importantes tenemos aquellos ensayos que utilizan la tecnología TaqMan. De forma general, el Real Time-RT-PCR es una técnica altamente sensible y es aplicable no solamente a la detección rápida de IBV, sino que además puede cuantificar ARN genómico en muestras clínicas (Callison y col., 2005). No obstante, bajo algunas circunstancias la prueba de Real Time RT-PCR puede conllevar a pobres resultados debido a las limitaciones propias de la divergencia de nuevas variantes patogénicas (Abro 2013). Por lo tanto, la tipificación de cepas de IBV en la mayoría de los casos se basa en el análisis comparativo de las secuencias de nucleótidos de la región variable del gen S1.

Diagnóstico serológico

Las pruebas serológicas para el diagnóstico de IBV incluyen los ensayos de Inmuno Absorbancia ligada a Enzima (ELISA; basada en el uso de anticuerpos monoclonales), Pruebas de Virus Neutralización (VN; tipo-específica), Inhibición de la Hemaglutinación (IH), Inmunofluorescencia Indirecta e Inmuno Difusión en Agar Gel (Dhama y col., 2014). No obstante, debemos considerar que las vacunas a virus vivo han sido utilizadas en muchos países por lo que las pruebas serológicas podrían fallar en la detección de variantes antigénicas con epítopes modificados. Debido a que las muestras de suero procedentes de aves adultas pueden contener anticuerpos con alto grado de reacción cruzada con cepas no relacionadas a IBV, el serodiagnóstico de un brote de IBV no presenta un alto grado de confiabilidad (OIE (Oficina Internacional de Epizootias) 2013).

El ELISA es un método diagnóstico de gran utilidad con mejores resultados y valores diagnósticos que otros ensayos serológicos. A pesar de que el método carece de especificidad para

determinadas variantes virales, es útil para el monitoreo de vacunaciones en condiciones de campo. Su uso no es oneroso y se pueden diagnosticar un número grande de muestras a la vez. Los kits comerciales pueden detectar anticuerpos luego de una semana de la inyección (Jackwood and de Witt 2013). Existen diferentes kits comerciales en el mercado, basados en diferentes estrategias para la detección de anticuerpos. El ELISA es ampliamente utilizado para la identificación de lotes de aves infectados, basado en un alto título de anticuerpos (Cavanagh and Gelb 2013).

Otra alternativa de diagnóstico serológico es el uso de la Inmunodifusión en Agar gel (AGID) (Witter 1962). Para el desarrollo de esta prueba, el antígeno es preparado mediante un homogenizado de membranas corioalantoideas de embriones de pollos infectados. La cepa Beaudette es usualmente empleada como fuente antigénica. No obstante la prueba presenta una baja sensibilidad y puede brindar resultados inconsistentes como la presencia y duración de anticuerpos precipitados que pueden variar a nivel individual (Cavanagh and Gelb 2013).

12. Epidemiología

La BI es prevalente en todos los países con un sistema de crianza intensiva, alcanzando una incidencia de infección de incluso 100% en varios lugares (Ignjatovic and Sapats 2000), siendo el agente viral de mayor impacto económico en la industria avícola, pues afecta tanto la producción de carne como la producción de huevos (Cavanagh 2007). Por ejemplo, en la industria de broilers, las pérdidas productivas debido a bajas ganancias de peso y mortalidad han sido asociadas a infecciones con IBV, mientras que en aves de postura, se han observado pérdidas económicas debido a la baja producción y calidad de los huevos (Ignjatovic and Sapats 2000).

El virus de IBV presenta una distribución mundial, afectando principalmente a las áreas geográficas de producción avícola intensiva. A diferencia de otros virus, IBV afecta únicamente a los pollos y no a pavos y faisanes, aunque estas especies pueden presentar Coronavirus propios. Sin lugar a dudas, el más grande problema relacionado a la epidemiología de IBV es la aparición de nuevas variantes. Por ejemplo, a pesar que en Europa el número de variantes de gran importancia durante los

últimos 50 años es relativamente bajo, la aparición de variantes en Holanda (Dutchtypes) en los años 70 y la aparición de las cepas Italia 02 y QX hacen la emergencia del virus impredecible (Jones 2010).

Cepas y serotipos en los últimos años

En la mayoría de los países latinoamericanos no hay investigación consistente, organizada ni permanente sobre la BI. Sin embargo, diagnósticos serológicos y de aislamiento, y mayoritariamente evidencias de campo (clínicas, patológicas y productivas) permiten reconocer una alta prevalencia de la enfermedad en la población avícola de muchos países. En algunos países latinoamericanos se ha detectado tanto las cepas Massachusetts y Connecticut como otras cepas que muestran diferencias mayores al compararlas con el serotipo Massachusetts, como fue el caso de Colombia en el año 2005, donde se estudiaron 16 aislamientos procedentes de aves padeciendo fuertes problemas respiratorios, resultando en que 12 aislamientos fueron clasificados en 4 genotipos diferentes a las cepas Mass y Connecticut. Situaciones similares han ocurrido en México y Venezuela (Jackwood 2012).

Los análisis moleculares y la comparación de secuencias de algunos de estos virus sugieren que corresponden a cepas autóctonas de cada país o región, sin embargo, es necesario realizar experimentos in vivo para determinar si los cambios detectados molecularmente realmente corresponden a cepas lo suficientemente diferentes contra las cuales las vacunas comerciales existentes no ofrecen niveles de protección suficientes (Jackwood 2012). Estudios serológicos en Chile y en el extranjero demuestran que cepas del serotipo Massachusetts (MASS) están presentes en todos los países que reconocen la enfermedad y siguen siendo las cepas de mayor prevalencia internacional (Cubillos y col., 1991b; Toro y col., 1990).

En Chile, el primer reporte de IBV fue realizado en el año de 1975 (Hidalgo y col., 1976). Durante los años ochenta, IBV fue reportado como un serio problema de aves comerciales y la aparición de variantes así como los serotipos Mass y Conn en lotes de aves sumado a la pobre protección mediante el uso de vacunas Mass fueron una característica común (Cubillos y col., 1991c). Ha habido evidencias serológicas de la presencia de cepas del serotipo Arkansas en México,

Colombia, El Salvador y Guatemala (Jackwood y col., 2005). En Costa Rica se ha reportado el aislamiento del virus y en Brasil también se comunicó en 1985 el aislamiento de una cepa similar a ARK. En Brasil se reconoce la presencia de cepas de los serotipos Massachusetts, Connecticut, JMK, Gray, Holte y Arkansas (Jackwood y col., 2005). En Brasil se estudiaron más de 250 aislamientos que se clasificaron en tres grupos denominados BR1, BR2 y BR3 (Jackwood 2012). En Brasil un estudio sobre los diagnósticos efectuados por 4 laboratorios durante el año 1990, reveló que la BI representaba entre el 12,5 y el 37,5% de las enfermedades respiratorias diagnosticadas (Abreu y col., 2006). Un alto porcentaje de estas cepas tienen similitudes con la cepa 4/91 (serotipo 793/B) que está representada por una vacuna comercializada en Europa y ahora presente en muchos países (Jackwood 2012).

Durante la década del 80 se describen en Chile aislados del VBI obtenidos de pollos broilers o gallinas con problemas respiratorios a pesar de estar vacunadas contra BI con cepas MASS. También se describen en 1982 y 1984 aislados nefropatogénicos del VBI obtenidos de pollos broilers y gallinas ponedoras respectivamente. Algunos de estos aislados demuestran ser antigénicamente diferentes a los serotipos convencionales y constituye una cepa variante denominada G-85. En 1989 se comunica la evidencia serológica de algunos lotes de aves positivos al serotipo D 207 (Cubillos y col., 1991a).

La situación en otras partes del mundo no es muy diferente. En Australia se han reportado 8 serotipos de virus, en Japón hay varios serotipos, en Bélgica se reporta la cepa nefrotrópica B1648, en Francia la cepa PL84084 y en Inglaterra se reporta la existencia de 8 serotipos, donde la cepa 4/91 parece ser la de mayor prevalencia (Benyeda y col., 2010; Escorcia y col., 2000; Jackwood 2012). Otra nueva cepa es la llamada Italia 02 que también se ha encontrado en España (Worthington y col., 2008b). En Taiwán los virus de bronquitis infecciosa se han dividido en dos grupos denominados TQ-1 y TW-2 (Jackwood 2012). En este país las cepas heterólogas al tipo Massachusetts son ampliamente utilizadas como vacunas de campo. Asimismo, en Túnez tres cepas del virus

mostraron similitud con la cepa CR88 y con la D274, distantes a la cepa Massachusetts (Jackwood 2012).

La cepa QX aislada en Qingdao (China) en 1996 ha suscitado bastante interés. El aislamiento se reportó dos años después, pero se ha diseminado por Europa. Los primeros reportes de la cepa en Europa fueron en Holanda y de ahí pasó a Alemania, Bélgica, Francia y otros países. Se han encontrado cepas con un alto porcentaje de homología con la cepa QX y con la cepa Q1. Se ha desarrollado una vacuna comercial (L1148) para el control de la cepa QX en Europa.

La cepa Q1, actualmente presente en Chile, fue aislada en China entre 1996 y 1998 de pollitas de recría afectadas por problemas respiratorios y proventriculitis y se estima que puede haberse diseminado a otros países como el nuestro, Colombia, Argentina, Italia, Holanda. Brasil posee variantes propias de Bronquitis Infecciosa aviar (Br-I).

El Cuadro 1 y el Cuadro 2 presentan las cepas de Bronquitis Infecciosa aviar aisladas de las Américas, detallando la cepa, el tipo de cepa y su registro en GenBank. Asimismo, el Cuadro 3 presenta las cepas de virus de bronquitis infecciosa aisladas de Europa y Asia Occidental. Finalmente, el Cuadro 4 presenta las cepas del virus de Bronquitis Infecciosa aisladas de Asia.

Cuadro 1. Cepas de Bronquitis Infecciosa aisladas en Norteamérica

Región/País	Cepa	Tipo	GenBank no.	Referencia
Mexico	Mexico/Ark type	Arkansas	NA	(Quiroz <i>et al.</i> , 1993)
	Mexico/Conn/43/UNAM/08	Conn	EU526403	(Jackwood 2012)
	Mexico/Mass/4/UNAM/08	Mass	EU526411	(Jackwood 2012)
	Mexico/47/UNAM/01	?	EU526405	(Jackwood 2012)
	Mexico/7277/99	?	AF363596	(Gelb, Jr. <i>et al.</i> , 2001; Lee and Jackwood 2000)
	Mexico/BL56-19/UNAM/08	BL56	EU526407	(Escorcía <i>et al.</i> , 2000; Gelb, Jr. <i>et al.</i> , 2001)
	Mexico/07484/98	?	AF2884Villarreal	(Callison <i>et al.</i> , 2001)
	Mexico/UNAM-97/97	?	NA	(Jackwood 2012)
Estados Unidos	Ark/ArkDPI/81	Arkansas	AF006624	(Cavanagh and Gelb 2014)
	CA/557/03	California	DQ912828	(Jackwood <i>et al.</i> , 2007)
	CA/1737/04	California	DQ912830	(Jackwood <i>et al.</i> , 2007)
	CA/CAL99/CAL99/99	Cal99	DQ912831	(Mondal and Cardona 2007)
	CA/CAV/CV56b/91	California	AF027509	(Schikora <i>et al.</i> , 2003)
	Conn/Conn46/51	Conn	L18990	(Cavanagh and Gelb 2014)
	DE/DE072/92	Delaware	U77298	(Gelb, Jr. <i>et al.</i> , 1997)
	GA/GA11/124/11	GA11	NA	(Jackwood 2012)
	GA/GA08/GA08/08	GA08	GU361606	(Jackwood <i>et al.</i> , 2010b)
	GA/GA07/GA07/07	GA07	JN160805	(Jackwood 2012)
	GA/GA98/0470/98	GA98	AF274437	(Lee <i>et al.</i> , 2003)
	Mass/Mass41/41	Mass	AY561711	(Cavanagh and Gelb 2014)
	PA/Wolgemuth/98	Wolgemuth	AF305595	(Ladman <i>et al.</i> , 2006)
	PA/171/99	PA/171	AF419314	(Ziegler <i>et al.</i> , 2002)

Cuadro 2. Cepas de Bronquitis Infecciosa aisladas en Sudamérica

Región/País	Cepa	Tipo	GenBank no.	Referencia
Brasil	Brazil/Ark type	Arkansas	NA	(Jackwood 2012)
	Brazil/BR1/USP-28/08	BR1	FJ791269	(Villarreal <i>y col.</i> , 2010)
	Brazil/BR2/USP-21/08	BR2	FJ791262	(Villarreal <i>y col.</i> , 2010)
	Brazil/BR3/USP-16/07	BR3	FJ791257	(Villarreal <i>y col.</i> , 2010)
	Brazil/793B/USP31/08	793B	FJ791272	(Villarreal <i>y col.</i> , 2010)
	Brazil/USP-01/05	?	DQ355995	(Villarreal <i>y col.</i> , 2010)
	Brazil/Mass/USP15/08	Mass	FJ791256	(Villarreal <i>y col.</i> , 2010)
Colombia	Colombia/LDL/Q192079/12	LDL	NA	(Jackwood 2012)
Chile	Chile/LDL/Q112103b/09	LDL	HM446012	(Jackwood 2012)
	Chile Q1 12.216			APA Chile
	Chile Q1 12.185			APA Chile
	Chile Q1 12.124			APA Chile

	Chile Q1 12.078			APA Chile
--	-----------------	--	--	-----------

Cuadro 3. Cepas del virus de Bronquitis Infecciosa en Europa y Asia Occidental (Jackwood)

Región/País	Cepa	Tipo	GenBank no.	Referencia
Europa Occidental	UK/793B/ 4/91	793B	AF093794	(Cavanagh y col., 2005)
	France/CR88/CR88121/88	CR88	JN542567	(Cavanagh y col., 2005)
	Italy/624I/94	624I	AJ243261	(Capua y col., 1994)
	Italy/Italy-02/497/02	Italy-02	DQ901377	(Worthington y col., 2008a)
	Italy/LDL/Q1-11VIR3141-7/11	LDL	JQ290229	(Jackwood 2012)
	Western Europe/Mass/ H120	Mass	EU822341	(Worthington y col., 2008a)
	Netherlands/D207/79	D207	X58003	(Cavanagh y col., 1997)
	Netherlands/D1466/79	D1466	M21971	Cavanagh, 1997)
	Netherlands/LX4/QX-D388/04	LX4	DQ674739	(de Wit y col., 2011)
	Belgium/B1648/96	B1648	X87238	(Meulemans y col., 2001)
	Spain/LX4-like/ QX-La/ 116/09	LX4	GQ253485	(Jackwood 2012)
	UK/B/D274/84	D274	X15832	(Worthington y col., 2008a)
	UK/E/D3896/84	D3896	X52084	(Cavanagh and Davis 1988)
Rusia/Ucrania/ Kazakstán/Slovenia	Russia/Mass/13/09	Mass	HQ840475	(Ovchinnikova y col., 2011)
	Russia/793B/24/09	793B	HQ840487	(Ovchinnikova y col., 2011)
	Russia/D274/15/09	D274	HQ840495	(Ovchinnikova y col., 2011)
	Russia/LX4/QX-RF05/ 07	LX4	HQ840500	(Ovchinnikova y col., 2011)
	Ukraine/Italy-02/01/07	Italy-02	HQ840498	(Ovchinnikova y col., 2011)
	Kazakhstan/Ark/KZ14/07	Arkansas	HQ840499	(Ovchinnikova y col., 2011)
	Slovenia/Italy-02/257/09	Italy-02	GU564326	(Krapez y col., 2010; Krapez y col., 2011)

**Cuadro 4. Cepas del virus de Bronquitis Infecciosa en Asia
(actualizado de Jackwood,2012)**

Región/País	Cepa	Tipo	GenBank no.	Referencia
China/Taiwán	China/LX4/QX/99	LX4	AF193423	(Han <i>et al.</i> , 2011)
	China/LDT3/03	LDT3	AY702975	(Han <i>et al.</i> , 2011)
	China/LHLJ/951	LHLJ	DQ167141	(Han <i>et al.</i> , 2011)
	China/BJ/97	BJ	AY319651	(Han <i>et al.</i> , 2011)
	China/LDL/Q1/98	LDL	AF286302	(Han <i>et al.</i> , 2011)
	China/N1/62/JAAS/04	Subgroup 1	AY839140	(Han <i>et al.</i> , 2011)
	China/LSC/991	LSC	DQ167147	(Han <i>et al.</i> , 2011)
	China/793B/Sichuan/06	793B	GQ844991	(Han <i>et al.</i> , 2011)
	China/Mass-H120/ SDLY0612/06	Mass	EU857816	(Han <i>et al.</i> , 2011)
	Taiwan/LDL/Q1-3374/05	LDL8	DQ402364	(Jackwood 2012)
Corea	Korea/KM91/91	KM91	FJ807946	(Lee <i>et al.</i> , 2008; Lim <i>et al.</i> , 2011)
	Korea/KI/K620/02	K-I	FJ807944	(Lee <i>et al.</i> , 2008)
	Korea/LX4/KII/K154/05	K-II (LX4)	FJ807922	(Lee <i>et al.</i> , 2008)
	Korea/KIII/K147/10	K-III (LDL)	HM486961	(Lee <i>et al.</i> , 2008)
	Korea/Mass/K446/01	Mass	AY257063	(Lee <i>et al.</i> , 2008)
India	India/LKW/56/IVRI/08	Mass	HM163471	(Sumi <i>et al.</i> , 2012)
	India/NMK/72/TVRI/10	abr-91	HM748585	(Sumi <i>et al.</i> , 2012)

Control de brotes

Una vez identificado un brote de bronquitis infecciosa en un lote vacunado, el primer paso del control es la identificación de la variante y el segundo es definir la patogenicidad en aves donde se pruebe la eficacia de planes de vacunas y/o combinaciones de vacunas (Jackwood 2012). Cuando el brote se expande y ninguna vacuna comercial es capaz de proveer una protección adecuada, a veces se hace necesario desarrollar una vacuna específica para controlar la enfermedad. En este caso, la estrategia es preparar vacunas con virus muerto o desarrollar cepas vacunales vivas atenuadas preparadas a partir de la variante nueva (Cook y col., 2012). Hay que tener mucho cuidado al preparar vacunas vivas atenuadas a partir de una cepa nueva debido a la capacidad del virus para mutar rápidamente (Jackwood y col., 2010a) o combinarse con otras cepas de bronquitis infecciosa (Thor y col., 2011), lo que podría devenir en la aparición de una nueva cepa capaz de producir enfermedad (Jackwood y col., 2010a).

Limitaciones para el control del IBV

El virus de la bronquitis aviar y en general todos los coronavirus exhiben una enorme variabilidad genética que viene determinada por una gran capacidad de mutación y recombinación. Esta capacidad de variación genética se traduce en una enorme variabilidad antigénica del virus. Poco después de su descubrimiento se observó que las diferentes cepas de virus circulantes presentaban diferentes características antigénicas. Este hecho ha complicado el control de la enfermedad dado que las vacunas vivas no presentan una buena protección frente a virus heterólogos (Hofstad 1958). Igualmente ha complicado su diagnóstico ya que es necesario no solo confirmar la presencia del virus,

sino averiguar de qué virus se trata. Es un patógeno con una elevada capacidad de cambio, que le permite escaparse y adaptarse a nuevas situaciones adversas (Jackwood 2012).

Evidencia científica sugiere que la existencia de variabilidad en los niveles de infección en pollos está asociada con la severidad de IBV y a su vez, con el nivel de la respuesta inmune. La principal razón de la variabilidad del perfil de respuesta inmune contra IBV se debe a la existencia de un gran número de serotipos. De hecho, IBV ha demostrado ser una mixtura de variantes genéticas donde quasi especies son generadas por eventos de mutaciones y recombinaciones genéticas (Domingo y col., 1985), además, nuevas variantes del virus continúan apareciendo debido a las tasas de mutación y recombinación del genoma viral, haciendo al virus difícil de identificar y extremadamente difícil de controlar (Jackwood 2012). Tres serotipos comunes son reconocidos en Norteamérica: Massachusetts, Connecticut y Arkansas 99.

Los estudios moleculares han demostrado que un nuevo serotipo o variante de IBV puede emerger como resultado de únicamente de sustituciones en secuencias de aminoácidos en la región S1 de la proteína de espiga (spike protein) mientras que la mayoría del genoma viral permanece invariable (Cavanagh 2007). Entre las causas más probables de estos fenómenos se encuentran la presión inmunológica debido al uso de vacunas vivas, el hecho de ser un proceso de replicación de tipo RNA no correctivo, fenómenos de recombinación genética como consecuencia de infecciones mixtas o la reducción de serotipos dominantes debido a las vacunaciones, permitiendo que otras cepas de campo puedan emerger (Lee and Jackwood 2000; Liu y col., 2006).

El objetivo de las técnicas diagnósticas es mejorar la prevención frente a la enfermedad para los siguientes ciclos de producción. El control de la IB se basa en la vacunación con vacunas vivas atenuadas y vacunas inactivadas. Las cepas vacunales atenuadas son virus que mantienen la capacidad de replicarse en los tejidos, aunque en menor grado que las cepas de campo. Permiten por tanto la inducción de una mayor respuesta inmune en los animales, aparte de ser más fáciles de administrar (aerosol o en el agua). El principal inconveniente de estas vacunas es la posibilidad de producir

reacciones vacunales adversas, es decir, cuadros respiratorios causados por la replicación de la cepa vacunal. Las cepas inactivadas contienen virus muertos y se aplican únicamente a aves ponedoras o reproductoras previamente vacunadas con cepas vivas antes de la puesta para inducir niveles de anticuerpos elevados, uniformes y de larga duración (Ignjatovic and Sapats 2000).

Debido a la alta variabilidad y las importantes propiedades biológicas de la proteína S1, la evolución antigénica de IBV va a estar asociada primariamente con cambios en la secuencia génica de S1 que contiene regiones asociadas a la unión del virus con receptores celulares y epítopes relevantes que inducen la producción de anticuerpos neutralizantes (Cavanagh y col., 1988). De hecho, determinantes de serotipo han sido identificados en los primeros 395 regiones de aminoácidos de la subunidad S1, la cual contiene 3 regiones hipervariable (Cavanagh y col., 1988). El fenómeno de recombinación entre variantes antigénicas podría actuar además como un mecanismo de variación genética, mientras que variantes inmunofenotípicas que resultan en la selección de mejores cepas adaptadas de IBV, exhiben diferentes antígeno-tipos, protectotipos y patotipos (diferente tropismo tisular) (Thor y col., 2011).

Clasificación mediante protectotipos

Mediante la comparación por protectotipos, el patrón completo de la respuesta inmune de los pollos contra una variante de IBV es medida. La agrupación de diferentes cepas o variantes virales en protectotipos es el sistema de clasificación más adecuado desde un punto de vista práctico, ya que proporciona información directa sobre la eficacia de una vacuna. En base a esta clasificación, cepas virales que inducen cierto grado de protección hacia otras cepas en pollos pertenecen al mismo protectotipo (de Witt and van der Heijden 2010). No obstante, es un sistema de clasificación laborioso debido a que requiere la utilización de huevos SPF e instalaciones de alta calidad para la realización de los ensayos de vacunación y desafío viral.

Clasificación mediante serotipos

La clasificación de IBV mediante serotipos se basa en la reacción de una cepa o variante de IBV hacia anticuerpos específicos de determinado serotipo. Bajo este sistema de clasificación, dos cepas virales serán consideradas en el mismo serotipo si sus títulos de neutralización heterólogos (antisuero de A con virus B; antisuero de B contra virus A) (Hesselink 1991). Debido a la aparición cada vez mayor de variantes de IBV, la clasificación por serotipos resulta menos práctica ya que cada serotipo requiere su propia prueba de neutralización. Por ello, conforme incrementan nuevas variantes de IBV, la serotipificación resulta menos práctica (de Wit y col., 2010). Por ejemplo, un gran número de serotipos tales como Arkansas, Connecticut (Conn), Massachusetts (Mass), 4/91, 793B, Italy-02, Beaudette, Georgia 98 y QX han sido reportadas e identificadas alrededor del mundo (de Witt y col., 2011; Hesselink 1991; Jackwood y col., 2003). Empero, debemos considerar que hoy en día la serotipificación de nuevas cepas/variantes de IBV está siendo menos utilizada, debido a que las pruebas serológicas requieren un panel de anticuerpos específicos de serotipo, el cual no es fácil de conseguir, por lo que hoy en día se prefiere el uso de métodos moleculares (Abro y col., 2012).

Clasificación mediante genotipos

La genotipificación de las variantes de IBV se basa en la caracterización genética del genoma completo o parte del genoma. Las técnicas utilizadas incluyen el secuenciamiento, detección de segmentos específicos mediante RT-PCR o determinación de clivaje enzimático (de Witt 2000). La secuencia utilizada mayormente para la genotipificación viral corresponde a la región genómica que codifica a la unidad S1 de la proteína de la espiga, la cual es la principal inductora de inmunidad protectora y porta la mayor cantidad de epítopos para anticuerpos neutralizantes (de Witt and van der Heijden 2010).

La genotipificación de IBV se basa en la amplificación de la secuencia altamente variable de la región del gen S1 mediante análisis de PCR-RT, seguido por secuenciamiento (de Witt 2000; Jackwood y col., 1992). El diagnóstico molecular ha demostrado que diferentes genotipos, entre ellos

Massachusetts, 4/91, Italy 02, y variantes Europeas similares a QX se encuentran circulando en países como Dinamarca, Bélgica, Hungría, Francia, Alemania, Holanda, Rusia, Eslovenia,

España, Suecia y Reino Unido (Abro y col., 2012).

Uso de vacunas activas o a virus vivo permitidas en Perú

Dentro de las normativas del Servicio Nacional de Sanidad Agraria, en nuestro medio sólo está permitido el uso de vacunas para la prevención de la Bronquitis Infecciosa aviar, aquellas que sean de origen del tipo Massachusetts (Mass). En el Cuadro 5 y Cuadro 6 se describen algunas de las vacunas activas o a virus vivo e inactivadas, respectivamente; que son utilizadas en nuestro medio.

Cuadro 5. Vacunas activas o a virus vivo utilizadas en Perú para la prevención de la Bronquitis Infecciosa Aviar

Laboratorio	Vacuna				Composición / Cepas				
MSD	Nobilis	IB	H120		Virus activo de Mass, cepa	BI, H120	tipo		
	Nobilis	IB	Ma5		Virus activo de Mass, cepa	BI, Ma5	tipo		
Ceva	Cevac	BI	L		Virus activo de Mass, cepa activo de Hitchner B1	BI, B48 Virus NC, B1	tipo		
	Cevac	Bron	120	L	Virus activo de Mass, cepa	BI, H120	tipo		
Meril	Newcastle	B1B1	+		Virus activo de Mass	BI, tipo	tipo		
	Bronquitis Vivo)	Mass	(V.		Virus activo de B1 tipo	NC, B1	cepa		
	Bio	H120	Liofilizada		Virus activo de Mass, cepa	BI, H120	tipo		
Boehringer Ingelheim	Volvac	ND	IB	MLV	Virus vivo modificado Mass	BI, tipo			
					Virus vivo modificado cepa La Sota	NC, tipo			
Zoetis (FD)	Poultvac	Bron	H120		Virus activo de Mass, cepa	BI, H120	tipo		
	Poultvac	aereo			Virus activo de Mass, cepa activo de B1,	BI, H120 Virus NC, tipo B1,	tipo		
	Bronquitis	Mass			Virus activo de Mass, cepa	BI, H	tipo		
Biovet	New	Bron	Viva		Virus activo de H120	BI, cepa			

		Virus activo de NC, cepa La Sota
Hipra	Bronipra 1	Virus vivo atenuado BI, tipo Mass, cepa H120
Avipro (LAH)	IB M48	Virus activo de BI, tipo Mass, cepa M48
	ND-IB La Sota	Virus activo de BI, tipo Mass, cepa H120 Virus activo de NC, cepa La Sota

Cuadro 6. Vacunas inactivadas utilizadas en Perú para la prevención de la Bronquitis Infecciosa Aviar

Laboratorio	Vacuna	Composición / Cepas
MSD	Cor4+IB+ND+EDS	M 4 1
Ceva	Maximune 8	M 4 1
Merial	Gallimune 302 ND+IB+EDS	M 4 1
Boehringer Ingelheim	Volvac AC Plus+ND+IB+EDS KV	M 4 1
Zoetis	Poultvac Mix6	H120
Biovet	Inter Multi 7	H120
Hipra	Avisan Multi CO	H52
Avipro (LAH)	Avi Pro 401	DG

IV. MATERIALES Y METODOS

El presente estudio observacional permitió reevaluar las estrategias actuales de control contra brotes respiratorios compatibles con el IBV. El estudio incluyó como primer componente la identificación del agente involucrado a partir del brote en aves vacunadas; mientras que el segundo componente del estudio incluyó el manejo del brote considerando ensayos clínicos de protección cruzada con el objeto de evaluar el uso de diferentes programas vacunales para el control de la variante antigénica obtenida.

Granja afectada

Descripción y localización. - La granja estaba ubicada a 150 km al norte de la ciudad de Lima. La granja era de pollos de engorde y constaba de 10 galpones albergando aproximadamente a 200,000 aves. La granja tenía “galpones abiertos”, constituidos por piso de tierra con estructuras de palo de eucalipto, cortinas laterales y techo de tela de polipropileno. Las aves eran de la línea genética Ross 308.

Programa sanitario de la granja en estudio

En la Cuadro 7 se describen las vacunas utilizadas, así como la vía de aplicación en la etapa de crianza en los pollos de engorde de la granja afectada. La primera vacunación contra la Bronquitis Infecciosa fue aplicada en la planta de incubación, mientras que la revacunación fue realizada en la granja. Ambas vacunas fueron aplicadas acorde a las recomendaciones del fabricante y en buen estado de salud de las aves.

Cuadro 7. Programa de vacunación

Edad (días)	Vacuna (cepa)	Vía de aplicación
1	Newcastle (<i>BIBI</i>) Bronquitis Infecciosa (<i>Mass</i>)	Spray
10	Gumboro	Agua de bebida
15	Newcastle (<i>La Sota</i>) Bronquitis Infecciosa (<i>Mass</i>)	Agua de bebida

Descripción del brote

Los signos observados, por el año 2005, fueron problemas respiratorios moderados (ronquera y secreciones nasales). Adicionalmente las aves se mostraban deprimidas. Los signos clínicos se observaron a partir de los 34 días de edad. La mortalidad al final de campaña (45 días de edad) fue de 4.34% con un Índice de Conversión (IC) de 1.86 y un Factor de Eficiencia Europeo (IEE) de 300.48

El diagnóstico presuntivo de Bronquitis Infecciosa surgió como consecuencia de problemas respiratorios recurrentes. No se observaron signos clínicos ni lesiones compatibles con la Enfermedad de Newcastle, Laringotraqueítis Aviar o de Metapneumovirus Aviar.

Se tomaron muestras de tráquea y pulmones de las aves afectadas. Se realizó un homogeneizado de las mismas y posteriormente, este material fue inoculado en la cavidad alantoidea en huevos embrionados de 9 días. La cantidad del inóculo fue de 0.1 – 0.2 ml. Posteriormente, 5 días después se hizo la embriodiagnósis y se tomó líquido alantoideo de aquellos embriones que mostraron signos de enanismo y encorvamiento. Este material (20 muestras de líquido alantoideo) fue enviado al laboratorio de Investigación y Desarrollo de Intervet en Holanda. Allí se realizaron pruebas moleculares porque la secuencia de la proteína de la espícula del virus de Bronquitis Infecciosa es utilizada para la identificación.

Diagnóstico clínico del brote

El diagnóstico presuntivo de Bronquitis Infecciosa se concluyó como consecuencia de los problemas respiratorios recurrentes en la granja de crianza y que no había otras observaciones de lesiones en otros órganos como se observa en la Enfermedad de Newcastle, Laringotraqueítis o infecciones causadas por Metapneumovirus Aviar.

Las pruebas serológicas locales (ELISA–Idexx) mostraron perfiles elevados para Bronquitis Infecciosa.

El aislamiento y las pruebas serológicas moleculares de identificación se llevaron a cabo en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Intervet en Holanda.

Diagnóstico y evaluación del brote

Luego de reportarse un brote compatible con Bronquitis Infecciosa; en un lote vacunado de pollos de engorde, en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Intervet, se aplicó un diseño experimental u observacional, en base a 20 muestras de líquido alantoideo, para determinar la causa del brote. Brevemente, las muestras se enviaron al laboratorio para descartar la participación de

Síndrome de Cabeza Hinchada, Newcastle y Bronquitis Infecciosa. Se enviaron muestras de aves afectadas para tratar de aislar el virus y confirmar el tipo de virus con serología y PCR.

Vacunación y desafío

El segundo componente del estudio incluyó el manejo del brote considerando ensayos clínicos de protección cruzada con el objeto de evaluar el uso de diferentes programas vacunales para el contra la variante antigénica obtenida (Cook y col., 1999). El aislamiento se efectuó empleando cultivo en huevos embrionados SPF como lo describe Qian (Qian y col., 2006) y la confirmación se hizo empleando PCR (Velayudhan y col., 2003; Wang and Khan 2000). La vacunación se aplicó de acuerdo a las indicaciones del proveedor de la misma; aplicándola directamente en el ojo de las aves, en los Grupos experimentales evaluados, detallados en el Cuadro 8. Los desafíos se realizaron con una gota del virus de la cepa aislada aplicada en el ojo de cada ave. Se consideraron cuatro grupos para evaluar cuatro programas de vacunación. Tres grupos recibieron un programa de vacunación cada uno y un cuarto grupo sirvió como control sin tratamiento.

Cuadro 8. Grupos experimentales evaluados

Grupo experimental	Protocolo de vacunación (edad)	Número de aves/grupo
Grupo 1	Día 1: cepa Mass (cepa Ma5)	10
Grupo 2	Día 14: cepa 4/91	10
Grupo 3	Día 1: cepa Mass (Cepa Ma5) Día 14: cepa 4/91	10
Grupo 4	No vacunado (control)	10

Para cada grupo se calculó un score de protección ciliar (CPS Ciliostasis protección score) con la siguiente fórmula (de Wit y col., 2013)

$$\text{Score de protección ciliar} = 100\% - \frac{(100 \times \text{Total de scores individuales})}{\text{número de individuos} \times 20}$$

Ensayos de ciliostasis

El nivel de protección de la tráquea se evaluó empleando Ensayos de ciliostasis en aves vacunadas y desafiadas con la cepa de campo aislada (de Wit y col., 2013).

La tráquea posee un mecanismo de defensa diseñado para proteger al organismo contra la invasión de agentes patógenos. Este mecanismo de defensa se llama aparato mucociliar. La superficie interna de la tráquea está cubierta de células epiteliales especializadas, las cuales están cubiertas con estructuras motiles parecidas a pelos llamadas cilios. Localizadas entre los cilios se encuentran células secretoras llamadas células caliciformes. El moco producido por las células caliciformes atrapa los agentes extraños y luego con la ayuda del movimiento unidireccional y coordinado de los cilios, el material es eliminado. El aparato mucociliar es extremadamente importante en el control de patógenos secundarios (*E. coli*, *Aspergillus* sp, etc). La pérdida de cilios (deciliación) resulta en una interrupción severa de las capacidades de defensa del aparato respiratorio. De la misma manera, es importante que el virus vacunal tenga un bajo efecto adverso sobre este importante mecanismo de protección contra enfermedades.

El objetivo del Ensayo de Ciliostasis fue determinar la actividad ciliar de la tráquea. En este sentido, el efecto de un virus sobre la mucosa traqueal puede ser medido y evaluado bajo dos formas:

- 1.- Evaluando la patogenicidad de un virus (vacunal) en aves no vacunadas
- 2.- Evaluando el nivel de protección en aves vacunadas

Para el Ensayo de Ciliostasis, se utilizaron 10 aves por grupo. Cinco días después del desafío; inmediatamente luego de sacrificar las aves, se tomaron explantes traqueales (Cultivo de Tráqueas o TOC) las mismas que se pusieron en medio de Hank's. Usando un bisturí se cortan 10 anillos de 2mm

de espesor (3 de la parte superior, 3 de la parte inferior y 4 de la parte media de la tráquea) de cada ave. Se separaron y se conservaron en el medio de cultivo a 37 °C. Los anillos se colocan sobre una laminilla para microscopía, la cual se colocó en una placa Petri, por separado para cada tráquea y finalmente se realiza la lectura de los anillos con ayuda de un microscopio a bajo aumento.

La actividad ciliar (ciliostasis) para cada cultivo traqueal (TOC) fue determinada por, al menos, dos técnicos independientes. El nivel de movimiento ciliar en cada anillo traqueal (TOC) se observó por medio de un microscopio y se expresó como un índice de 1 para explantes traqueales donde se observó movimiento entre el 75% al 99% de los cilios; índice de 2 cuando se observó movimiento entre el 50% al 74% de los cilios; índice de 3 cuando hubo movimiento ciliar entre el 25% a 49% de los cilios e índice de 4 cuando el movimiento ciliar se observó en menos del 25% de los cilios (Cook y col., 1999). En el Cuadro 9 se describen los índices de ciliostasis en los anillos traqueales.

Cuadro 9. Índice de ciliostasis

Indice	Ciliostasis (%)
0	Sin evidencia
1	25
2	50
3	75
4	100

Resultado del examen microscópico de la mucosa de la tráquea. -

- Si la ciliostasis es completa (0% de cilios con actividad) el índice máximo obtenido es

40 y por tanto no hay protección.

- Si el 50% o más de los cilios tienen actividad se obtiene un índice igual o mayor a 20 indicando protección

Consecuentemente, el nivel promedio de protección para un grupo de pollos resulta del porcentaje de los niveles de protección individual. Cuando se evalúa el nivel de protección en aves vacunadas, cuanto menor sea el índice de ciliostasis, mayor será el grado de protección (cruzada) que da el programa de vacunación.

Para efecto del presente trabajo, se utilizaron cuatro grupos experimentales organizados según se detalla en la Cuadro 8.

El desafío de los grupos experimentales con el aislado peruano se realizó a los 35 días de edad utilizando la cepa que produjo el brote. Las aves fueron sacrificadas al día 40 de edad de forma humanitaria y se tomaron muestras de los anillos traqueales. Se seleccionaron 10 anillos traqueales (3 anillos de la parte superior, 3 anillos de la parte inferior y 4 anillos de la porción media) por ave. Se evaluó la actividad ciliar de los anillos con la ayuda de un microscopio y se observó la actividad ciliar otorgando un índice de actividad ciliar de 0 (100% de cilios en movimiento) a 4 (0% de cilios en movimiento), tal cual se ha descrito en el Ensayo de ciliostasis. A menor grado de ciliostasis, mayor es el grado de protección cruzada que brinda el programa de vacunación. El resultado máximo posible de lesiones es de 40 (10 anillos X 4) – sin cilios en movimientos. Índices de 20 o menos (50% a 100% de cilios en movimiento) son indicativos de protección

Tamaño muestral

Basados en datos de variación usando scores de 0 a 4 y dentro de las aves de un mismo grupo cuando se examinan 10 anillos traqueales por individuo para detectar diferencias de 12.5% (los rangos cambian cada 25 puntos porcentuales, por lo que la amplitud de la diferencia mínima tendría que ser la mitad, 12.5). Dada la diferencia mínima y considerando una confianza del 95% y un poder del 80%

se emplearon 10 aves por grupo, tal cual se recomienda en el Cuadro 10, de tamaños muestrales para análisis de movimiento ciliar en explantes de tráquea (de Wit y col., 2013).

Cuadro 10. Número requerido de muestras usando 2, 5 o 10 explantes con 95% de confianza y 80% de poder(de Wit y col., 2013)

Table 3. Required number of chickens per group using 2, 5 or 10 TOCs (scoring 0 to 4) per chicken in order to be able to detect a significant difference (95% certainty, 80% power, two-sided) in mean CPS of 6.25%, 12.5%, 25%, 37.5% or 50% between groups post IBV challenge.															
Cluster	Required number of chickens per group using 2, 5 or 10 TOCs per chicken														
	6.25%			12.5%			25%			37.5%			50%		
	2	5	10	2	5	10	2	5	10	2	5	10	2	5	10
NC	5	4	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
PC	69	61	59	18	16	16	6	5	5	4	3	3	3	3	3
YoungHom	64	57	54	17	15	15	6	5	5	4	3	3	3	3	3
YoungHetSingle	431	413	406	109	104	103	28	27	27	13	13	13	8	8	8
YoungHetMulti	266	255	252	68	65	64	18	17	17	9	9	9	6	6	6
LayHomInac	281	260	252	71	66	64	19	18	17	9	9	9	6	6	6
LayHetInac	375	355	348	95	90	88	25	24	23	12	11	11	7	7	7
LayHetLive	651	629	622	164	159	157	42	41	40	20	19	19	12	11	11

Análisis de datos

Los resultados de las pruebas de laboratorio, desde la obtención de muestras hasta el diagnóstico molecular fueron descritos mediante cuadros de distribución, así como representados mediante diagramas. Por otro lado, los resultados del ensayo de protección cruzada, fueron presentados mediante un cuadro resumen. A partir de los valores promedio de score para cada grupo experimental, fueron presentados los niveles de protección como porcentajes (0-100%).

Consideraciones éticas

El presente trabajo fue diseñado y realizado acorde a los criterios éticos internacionales verificados por el comité de ética de la FMV-UNMSM (CEBA). La eutanasia de aves en condiciones de campo fue realizada de forma humanitaria, evitando el sufrimiento de los animales durante el procedimiento.

V. RESULTADOS

Diagnóstico y Evaluación del brote

Se tomaron 20 muestras de líquido alantoideo de aves afectadas para el aislamiento viral. Las muestras se mandaron al laboratorio de Investigación y Desarrollo de Intervet (R&D Service Laboratory, Intervet). Se aislaron dos agentes y se evaluó la presencia de tres agentes potenciales, el Síndrome de Cabeza Hinchada producida por el virus de rinotraqueitis del pavo (TRT), el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) y el virus de Bronquitis Infecciosa (IBV). El Cuadro 11 detalla los resultados del laboratorio.

Cuadro 11. Reporte del laboratorio de R&D de INTERVET

Prueba número	Referencia	Aislamiento		
		TRT	NDV	IBV
1	SL04A 0542	Negativo	Negativo	Positivo, sospechoso
2		Negativo	Negativo	Negativo

Se colectaron más muestras y se trató de serotipificar tres aislamientos posteriores tratando de tipificar la cepa de IBV del brote. Dos de las muestras de IBV no se pudieron tipificar pues no había antiseros contra ellas. Una de las cepas tuvo un 91% de homología con una cepa vacunal, M41. Las tres cepas de IBV se mandaron a caracterizar al laboratorio de Intervet (R&D Service Laboratory, Intervet-Holanda). Se confirmó la presencia de IBV en una de ellas, confirmándose que la cepa aislada considerada como sospechosa en la corrida SL04A0542 era una cepa IBV de tipo Massachusetts.

Ensayos de ciliostasis

La evaluación del Ensayo de ciliostasis evidencia que la doble vacunación (al día 1 con la cepa Ma5 y una segunda vacunación con la cepa 4/91 dos semanas después) confiere mejor protección (Índice de ciliostasis = 9.8) contra la cepa de IBV en estudio (Cuadro 12).

Cuadro 12. Resultados del test de ciliostasis

Grupo experimental	Protocolo de vacunación (edad)	Índice de actividad ciliar (promedio)	Porcentaje de protección
Grupo 1	Día 1 con Massachusetts (cepa Ma5)	20.3	40%
Grupo 2	Dos semanas con cepa 4/91	15.5	70%
Grupo 3	Día 1 (Cepa Ma5) Dos semanas (cepa 4/91)	9.8	100%
Grupo 4	No vacunado (control)	40	0%

VI. DISCUSION

Esta tesis reporta la aparición de una nueva variante de virus IBV en el Perú, aparentemente originado en una cepa vacunal (M41) correspondiente también al serotipo Massachusetts (Mass). Este hallazgo es interesante porque la cepa M41 se emplea en la producción de vacunas inactivadas y no en vacunas activas con virus vivo. En principio, no se puede descartar que exista una cepa de IBV que sea 91% homóloga a la cepa M41 y que la observación se deba al azar. Los virus de Bronquitis Infecciosa tienen una gran capacidad para mutar y recombinarse y no todas las cepas se han identificado ni menos caracterizado. Otra explicación para la aparición de aves infectadas con la cepa M41 sería que haya habido un error en la inactivación y haya virus vivo en el lote de vacunas inactivadas. Aunque poco probable de cara a los procesos de control de calidad empleados en la elaboración de vacunas, podría explicar la presencia de virus vivo. Todavía hay cepas vacunales a virus vivo sin mayor información como la M48 y cepa H. La presencia de probables cepas variantes del VBI ha sido señalada en Perú, Bolivia, Chile, Brasil y Argentina. En estos países se han presentado brotes de BI en aves vacunadas con cepas vacunales del serotipo MASS. Pollos broilers vacunados pueden presentar brotes de BI con cuadros respiratorios con alta mortalidad. En varias ocasiones la enfermedad respiratoria va acompañada de nefritis/nefrosis con variable mortalidad de las aves afectadas. En pollas de reposición vacunadas la BI se puede presentar en su forma respiratoria y renal. En ponedoras más bien se asocia la BI con disminución en la producción de huevos y alteración de la calidad de éstos (cáscara y albúmina) y en algunos casos con severo daño del tejido renal o urolitiasis. Durante la década del 70 en Chile se describió el aislamiento de cepas relacionadas con el serotipo MASS de varios brotes de BI respiratorio (Villegas P, 2014. Comunicación personal). El hallazgo de la segunda cepa aislada, compatible con el tipo Massachusetts, podría deberse a la recombinación de una cepa vacunal en el contexto de crianza de aves en lotes de edades múltiples, lo que facilitaría la recombinación de los virus vacunales.

Las primeras vacunas vivas se desarrollaron en los USA a partir del aislado Massachusetts M41. Entre ellas tenemos cepas con diferentes grados de atenuación (M48, B48, Connaught, L1, MM, etc.). Luego surgieron vacunas basados en aislamientos del tipo Connecticut y posteriormente las basadas en aislados Arkansas, Georgia 98 etc. Actualmente en USA se utilizan sobre todo las vacunas basadas en los serotipos Mass, Arkansas y Georgia, y una combinada (Mild Mass + Arkansas) (Abdel-Moneim y col., 2006).

Existen diferencias importantes entre los diversos países en lo que respecta al virus empleado para el desafío para la evaluación de la potencia y validación de la vacuna. Tradicionalmente, se ha utilizado para las pruebas de desafío la cepa virulenta M-41 (Mass 41) del tipo Massachusetts, tanto para vacunas vivas como inactivadas. Aunque lo más lógico es que los desafíos se realicen con el mismo tipo que está presente en la vacuna puede ser aconsejable preparar vacunas que protejan contra otros tipos. Establecer criterios para validar el virus de desafío puede ser difícil para otros tipos que no sean el Massachusetts debido a su menor virulencia. Normalmente, se piensa que las vacunas inactivadas protegen contra el descenso de la producción de huevos.

El virus de desafío tradicional M-41, causa un descenso en la producción de huevos, de al menos el 67% en controles no vacunados, pero cuando se usan otros tipos, se pueden considerar satisfactorios unos descensos menores dependiendo de la evidencia publicada sobre los efectos de estas cepas en condiciones de campo. Hay también una tendencia a relajar los criterios para desafíos con el tipo Massachusetts, y la Farmacopea Europea define ahora que un descenso satisfactorio con los tipos Massachusetts es de al menos el 35%, y, para tipos no Massachusetts, de al menos el 15%, con tal de que el descenso sea “proporcionado a la evidencia documentada”.

Para demostrar la eficacia, se debe hacer un ensayo de la vacuna con el inóculo primario y con el inóculo de trabajo después de cinco pases del inóculo primario, y realizar pruebas para demostrar su efecto protector. Para las vacunas vivas, se vacuna un mínimo de diez pollos SPF de 3–4 semanas con la dosis recomendada vía intranasal o intraocular. Se mantienen por separado diez

pollos control no vacunados de la misma edad y origen. Después de 3-4 semanas, todas las aves de ambos grupos se inoculan en desafío, vía intranasal o intraocular, con $10^{3.0}$ – $10^{3.5}$ EID₅₀ de la cepa virulenta Massachusetts M-41. Después de 4 – 5 días del desafío, se toma un frotis traqueal de cada ave y se coloca en 3 ml de caldo con antibióticos. Cada líquido se prueba para IBV inoculando (0,2 ml) cinco huevos embrionados de 9–11 días de incubación. Una prueba alternativa a la de tomar frotis consiste en sacrificar las aves a los 4–6 días de la inoculación de desafío y examinar microscópicamente los anillos traqueales para actividad de los cilios (Darbyshire 1985). La incapacidad de resistir un desafío se refleja en la pérdida de la movilidad de los cilios. La vacuna viva es adecuada para su empleo si, después del desafío, al menos el 90% de las aves vacunadas no muestran evidencia del IBV en sus tráqueas, mientras que en el 90% o más de las aves control debería de haber evidencia de la presencia del virus (OIE 2012)

La cepa Massachusetts M41 es usada mundialmente debido a que el aislamiento inicial del virus de la BIA en muchos países correspondía a este serotipo (Wakenell 1995). También es la cepa que más se ha empleado para desarrollar vacunas porque representa los aislamientos primarios de varios países (Mase y col., 2008). Esta cepa se replica primariamente en el tracto respiratorio y luego se dispersa en varios tejidos. En contraste, la cepa QX e IS/885/00 son primariamente nefropatogénicos (Benyeda y col., 2009; Meir y col., 2004). En la India, la mayoría de los virus de bronquitis es Mass (M41). Empero, aún empleando todos los cuidados, eventualmente produce brotes de bronquitis porque la cepa vacunal ha mutado (Sudhir y col., 2016).

Los métodos de genotipificación de la RT-PCR son utilizados para determinar la identificación de una cepa de campo. Se han investigado las bases moleculares de la variación antigénica, generalmente mediante secuenciación de los nucleótidos del gen que codifica la proteína de las proyecciones o espículas (S) o, más específicamente, por secuenciación de los nucleótidos del gen que codifica la subunidad S1 de la proteína S (Cavanagh, 1991; Kusters y col., 1989), que es

donde se encuentran la mayoría de los epítomos a los que se unen los anticuerpos neutralizantes (Koch y col., 1992).

Las principales ventajas de los métodos de genotipificación son: un tiempo rápido de respuesta y la habilidad para detectar una variedad de genotipos dependiendo de las pruebas utilizadas. Puede utilizarse el genotipo específico S1 de RT-PCR para identificar serotipos específicos del IBV (Keeler y col., 1998). Los cebadores específicos del gen S1 para serotipos de Massachusetts (Mass), Connecticut, Arkansas y JMK se utilizan en conjunción con un juego de cebadores universal que amplifica todos los serotipos del IBV. Se pueden identificar las infecciones causadas por múltiples serotipos de IBV. La secuenciación de los nucleótidos de un fragmento del gen S1 relevante para diagnóstico es la técnica más utilizada para la diferenciación de las cepas del IBV y se ha convertido en el método de genotipificación preferido en muchos laboratorios. Las pruebas de la RT-PCR se utilizan principalmente para la identificación del virus y su aplicación para el avance del conocimiento en las investigaciones epidemiológicas durante los brotes del IBV. Sin embargo, las pruebas de la RT-PCR, tal como existen ahora, no proporcionan información sobre la patogenicidad vírica.

Para la determinación de un protectotipo son necesarios los estudios de protección cruzada. En dichos estudios, aves vacunadas son desafiadas con diferentes grupos de distintas cepas de IBV, evaluándose posteriormente la inmunidad cruzada a dichas cepas mediante la evaluación de la actividad a nivel de la tráquea, observándose el grado de actividad ciliar de cada uno de los anillos traqueales de los animales desafiados (de Witt y col., 2011).

Hay que recordar que el test de ciliostasis expresa el porcentaje de protección de un programa vacunal frente al desafío con cepas de campo, a menor índice, mayor protección. El Cuadro 12 muestra que, si bien el grupo 2 (vacunación con la cepa 4/91 a las dos semanas de edad) mostró protección; el mejor resultado de protección contra las cepas aisladas durante el estudio se obtuvo en el grupo 3 (Vacuna el día 1 con la cepa Ma5 y refuerzo al día 14 con la cepa 4/91) que protegió al 100% de las aves. Sin embargo, en el Perú no está permitido el uso de la cepa 4/91, por ello es común el uso de

dos vacunas con la cepa Massachusetts. Una limitación del presente estudio es que no se evaluó el programa con dos vacunas Massachusetts.

Tras un brote de IB, la mayoría de los técnicos se plantean la necesidad de cambiar o no el programa vacunal en el siguiente lote y en caso de hacerlo, con que vacuna. Esta información es esencial para valorar la eficacia de las vacunas disponibles. Si el serotipo que ha sido el causante del brote es uno frente al cual existen vacunas homologas, vale decir, que la vacuna protegerá contra la cepa circulante. Si no existen cepas homologas se deberá recurrir al uso de más de un serotipo en el plan vacunal para incrementar el rango de protección a otros serotipos heterólogos, aunque la protección no sea completa (de Wit y col., 2013).

La prueba de protección cruzada demuestra que no se obtiene un nivel satisfactorio de protección con una sola aplicación de vacuna tipo Massachusetts contra el aislado peruano. En este brote en particular la mejor opción sería la de revacunar a las aves con una cepa de otro serotipo (4/91) a los 14 días de edad para mejorar el nivel de inmunidad cruzada. Debido a que la cepa 4/91 no está disponible en el mercado peruano, recomendaría para pollos de engorde la repetición de la vacunación con vacuna tipo Massachusetts (Ma5) a las 3 semanas de edad – de preferencia por aspersión de gota gruesa u ocular – manteniendo en cuenta que la protección podrá mejorar pero tal vez no llegará a un nivel ideal. Para la vacunación de ponedoras o reproductoras, se recomendaría la introducción de la vacuna que contengan diferentes serotipos del virus de la Bronquitis Infecciosa, la que proveerá a las aves con un amplio espectro de protección.

VII. CONCLUSIONES

- Se concluyó que la cepa de Bronquitis Infecciosa aislada no pertenece al serotipo Massachusetts o a los serotipos más comunes de esta enfermedad.

- A través de la prueba de ciliostasis se pudo determinar cual sería el mejor programa de vacunación para ofrecer una buena protección de las aves, contra el serotipo variante aislado.
- Considerando que en nuestro medio no es posible utilizar cepas variantes de Bronquitis Infecciosa, la cual resultó en la mejor protección, combinada con cepa del tipo Massachusetts, deberemos repetir la vacunación con vacuna del tipo Massachusetts.
- Incluir diferentes serotipos del virus de la Bronquitis Infecciosa para obtener un amplio espectro de protección en las aves.

VIII. INDICE ANALITICO

- 3a, 11 3b,
11
4/91, 13, 27, 31, 36, 41 46, 47, 47, 51, 52
793/B, 27, 32, 32, 36 aerosoles, 4, 20
África, 13 Aislamiento Viral, 22,
23, 46
albúmina, 14, 15, 48 Alemania, 27,
36 alphacoronavirus, 6 anillos
traqueales, 42, 43, 44, 50, 51
Argentina, 28, 48
Arkansas, 13, 26, 30, 31, 34, 36, 49, 51
Asia, 13, 28, 31, 32
Australia, 12, 13, 27
Bélgica, 27, 36
betacoronavirus, 6
Bolivia, 48
Brasil, 26, 28, 30, 48
Chile, 26, 27, 28, 30, 48 China, 27,
28, 32 ciliostasis, 2, 41, 42, 43, 44,
46, 47, 51 citotóxica, 16, 17
Colombia, 26, 28, 30
Connecticut, 5, 21, 25, 26, 34, 36, 49, 51
Control, 1, 2, 12, 16, 18, 21, 27, 33, 34, 38,
40, 41, 47, 48, 50
Coronaviridae, 4, 5, 6
Coronavirus, 4, 6, 8, 9, 14, 16, 25, 33
Costa Rica, 26 CR88,
27, 31 cuadro clínico,
5, 20 D274, 20, 21, 22,
27, 31
Diagnóstico, 19, 22, 23, 24, 25, 26, 33, 36,
39, 40, 44, 46, 51
El Salvador, 26
ELISA, 3, 18, 23, 24, 39
encefalitis hemaglutinante del cerdo,
8
Epidemiología, 21, 25
epítomos, 13, 20, 21, 22, 36, 51
España, 27, 36
espículas, 6, 8, 50
Estados Unidos, 3, 5, 12, 13
Europa, 12, 13, 21, 25, 27, 28, 31
fenotipo, 14
Francia, 27, 36
gammacoronavirus, 6 gansos, 13 genes, 12,
14, 18 genotipificación, 23, 36, 50, 51
genotipo, 14, 51 genotipos, 26, 36, 51
Guatemala, 26 heterófilos, 17 heterólogas,
20, 27
Holanda, 25, 27, 28, 36, 39, 40, 46 huevos,
5, 14, 15, 20, 23, 25, 35, 39, 40, 48, 49, 50
IgG, 19 IgM, 19
industria aviar, 1, 4
inhibición de hemaglutinación, 18, 23, 24
Inmunidad Celular, 16
Inmunidad humoral, 16, 17

Inmunidad innata, 16
Inmunidad materna, 19
Inmunodifusión, 24
Italia, 25, 27, 28
Japón, 27 linfocitos,
17 linfocitos T, 16, 17,
18 manejo, 1, 38, 40
Mass, 5, 16, 26, 27, 30, 31, 36, 37, 41, 48, 49,
50, 51
Massachusetts, 5, 20, 21, 25, 26, 27, 34, 36,
37, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52
México, 26 movimiento ciliar, 42, 44
mutaciones, 11, 13, 14, 21, 34
nefritis, 4, 14, 15, 48 nefrosis, 14, 15,
48 *Nidovirales*, 5 nucleocápside, 8, 11
palomas, 13 patogenicidad, 33, 42, 51
Patogenie, 14 patos, 4, 13
peplómeros, 6, 8 período de
incubación, 14 Perú, 1, 2, 37, 48, 52
protectotipos, 35
proteína integral de membrana (M),
11
proteína S, 8, 9, 10, 18, 20, 21, 22,
50
proteínas de membrana, 8, 11
proteínas E, 11 Qingdao, 27
QX, 13, 25, 27, 31, 36, 50
reacciones cruzadas, 23
recombinación, 13, 14, 21, 33, 34,
35, 48
RT-PCR, 3, 23, 36, 50, 51
S1, 8, 9, 18, 21, 24, 34, 35, 36, 50, 51 S2,
8, 9, 18, 22 salud animal, 1
serotipificación, 23, 26

serotipos, 9, 12, 20, 25, 26, 27, 34, 35, 36, 49,
 51, 52, 53 signos clínicos, 12,
 14, 39 síntomas, 4, 15, 19 Tamaño
 muestral, 44
 tipificación, 23, 24
 Transmisión, 4, 12, 20 urolitiasis,
 14, 15, 48
 viremia, 12, 14, 19 virión, 6, 8,
 9, 11 Virus Neutralización, 9, 18,
 23, 24

IX. REFERENCIAS

1. Abdel-Moneim AS, El-Kady MF, Sladman B, Gelb J. 2006. S1 gene sequence analysis of a nephropathogenic strain of avian infectious bronchitis virus in Egypt. *Virology Journal*, 3:78
2. Abreu JT, Resende JS, Flatschart RB, Folgueras-Flatschart AV, Mendes AC, Martins NR, Silva CB, Ferreira BM, Resende M. 2006. Molecular analysis of Brazilian infectious bronchitis field isolates by reverse transcription-polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism, and partial sequencing of the N gene 2. *Avian Dis* 50(4):494-501.
3. Abro S. 2013. Molecular characterization and detection of Infectious Bronchitis Virus [dissertation]. Upsala, Sweden: Swedish University of Agricultural Sciences. 1 p.
4. Abro SH, Renstrom LH, Ullman K, Isaksson M, Zohari S, Jansson DS, Belak S, Baule C. 2012. Emergence of novel strains of avian infectious bronchitis virus in Sweden 9. *Vet Microbiol* 155(2-4):237-46.
5. Banat GR, Tkalcic S, Dzielawa JA, Jackwood MW, Saggese MD, Yates L, Kopulos R, Briles WE, Collisson EW. 2013. Association of the chicken MHC B haplotypes with resistance to avian coronavirus 1. *Dev Comp Immunol* 39(4):430-7.
6. Beach J, Schalm O. A filterable virus, distinct from that of Laryngotracheitis, the cause of a respiratory disease of chicks. *Poultry Science* 1, 199-206. 1936. Ref Type: Journal (Full)
7. Beaudette F, Hudson C. 1937. Cultivation of the virus of Infectious Bronchitis. *J Am Vet Med Assoc* 90:51-60.
8. Beiras A. 2010. Bronquitis infecciosa aviar: diagnóstico y control. *REDVET Revista electrónica veterinaria*:1-23.

9. Belak S. 2007. Molecular diagnosis of viral diseases, present trends and future aspects A view from the OIE Collaborating Centre for the Application of Polymerase Chain Reaction Methods for Diagnosis of Viral Diseases in Veterinary Medicine 16. *Vaccine* 25(30):5444-52.
10. Benyeda Z, Szeredi L, Mato T, Süveges T, Balka G, Abonyi-Toth Z, Rusvai M, Palya V. 2010. Comparative histopathology and immunohistochemistry of QX-like, Massachusetts and 793/B serotypes of infectious bronchitis virus infection in chickens 18. *J Comp Pathol* 143(4):276-83.
11. Benyeda Z, Mató T, Süveges T, Szabó É, Kardi V, Abonyi-Tóth Z, Rusvai M, Palya V.
12. 2009. Comparison of the pathogenicity of QX-like, M41 and 793/B infectious bronchitis strains from different pathological conditions. *Avian Pathol.* 38: pp. 449-456
13. Brian DA, Baric RS. 2005. Coronavirus genome structure and replication 100. *Curr Top Microbiol Immunol* 287:1-30.
14. Callison SA, Hilt DA, Jackwood MW. 2005. Rapid differentiation of avian infectious bronchitis virus isolates by sample to residual ratio quantitation using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction 2. *J Virol Methods* 124(1-2):183-90.
15. Callison SA, Jackwood MW, Hilt DA. 2001. Molecular characterization of infectious bronchitis virus isolates foreign to the United States and comparison with United States isolates 2. *Avian Dis* 45(2):492-9.
16. Calnek B. 2002. *Enfermedades de las aves*. 8 ed. Mexico: 10 p.
17. Capua I, Gough R, Mancini M, Casaccia C, Weiss C. 1994. A "novel" infectious bronchitis strain infecting broiler chickens in Italy. *Zentralbl Veterinarmed* 41:83-9.
18. Caron L. 2010. Etiology and Immunology of Infectious Bronchitis Virus. *Revista Brasileira de Ciencia Avicola* 12(2):115-9.
19. Cavanagh D, Gelb J. 2013. Infectious Brochitis. In: Swayne D, Glisson J, McDougald LR, Nolan L, Suarez D, Nair V, editors. *Diseases of Poultry*. 13 ed. Ames, IA: WileyBlackwell; p 117-35.
20. Cavanagh D. 1981. Structural polypeptides of coronavirus IBV 13. *J Gen Virol* 53(Pt 1):931-3.
21. Cavanagh D. 1983. Coronavirus IBV: structural characterization of the spike protein 12. *J Gen Virol* 64 (Pt 12):2577-83.
22. Cavanagh D. 1984. Structural characterization of IBV glycoproteins 11. *Adv Exp Med Biol* 173:95-108.
23. Cavanagh D. 1991. Sequencing approach to IBV antigenicity and epizootiology. En: *Proceedings of the Second International Symposium on Infectious Bronchitis*. Rauschholzhausen, Germany, June 1991, 147– 160.
24. Cavanagh D. 2003a. Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus 11. *Avian Pathol* 32(6):567-82.
25. Cavanagh D. 2003b. Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus 3. *Avian Pathol* 32(6):567-82.
26. Cavanagh D. 2005. Coronaviruses in poultry and other birds 8. *Avian Pathol* 34(6):439-48.
27. Cavanagh D. 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus 2. *Vet Res* 38(2):281-97.
28. Cavanagh D, Davis PJ. 1988. Evolution of avian coronavirus IBV: sequence of the matrix glycoprotein gene and intergenic region of several serotypes 2. *J Gen Virol* 69 (Pt 3):621-9.
29. Cavanagh D, Davis PJ, Cook JK. 1992. Infectious bronchitis virus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype 1. *Avian Pathol* 21(3):401-8.
30. Cavanagh D, Davis PJ, Mockett AP. 1988. Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes 2. *Virus Res* 11(2):141-50.

31. Cavanagh D, Davis P. 2014. Sequence analysis of strains of avian infectious bronchitis coronavirus isolated during the 1960s in the UK. *Archives of Virology* 130:471-6.
32. Cavanagh D, Elus MM, Cook JK. 1997. Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection in vivo 1. *Avian Pathol* 26(1):63-74.
33. Cavanagh D, Picault JP, Gough R, Hess M, Mawditt K, Britton P. 2005. Variation in the spike protein of the 793/B type of infectious bronchitis virus, in the field and during alternate passage in chickens and embryonated eggs 1. *Avian Pathol* 34(1):20-5.
34. Chen H, huang Y, Wang C. 2014. Identification of Taiwan and China-like recombinant avian infectious bronchitis viruses in Taiwan 229. *Virus Res* 140(1-2):121-9.
35. Cook J, Otsuki K, Huggins M, Bumstead N. 1990. Investigations into resistance of chicken lines to infection with infectious bronchitis virus 4. *Adv Exp Med Biol* 276:491-6.
36. Cook JK. 1968a. Duration of experimental infectious bronchitis in chickens 4. *Res Vet Sci* 9(6):506-14.
37. Cook JK. 1968b. Duration of experimental infectious bronchitis in chickens 4. *Res Vet Sci* 9(6):506-14.
38. Cook JK, Huggins MB, Ellis MM. 1991. Use of an infectious bronchitis virus and *Escherichia coli* model infection to assess the ability to vaccinate successfully against infectious bronchitis in the presence of maternally-derived immunity 1. *Avian Pathol* 20(4):619-26.
39. Cook JK, Jackwood M, Jones RC. 2012. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathol* 41(3):239-50.
40. Cook JKA, Orbell SJB, Woods MA, Huggins M. 1999. Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathology*:477-85.
41. Cook J, Mockett A. 1995. Epidemiology of Infectious Bronchitis Virus. In: Siddel S, editor. *The Coronaviridae*. New York: Springer Science + Bussiness; p 317-25.
42. Cubillos A, Ulloa J, Cubillos V, Cook JK. 1991a. Characterisation of strains of infectious bronchitis virus isolated in Chile. *Avian Pathol* 20(1):85-99.
43. Cubillos A, Ulloa J, Cubillos V, Cook JK. 1991b. Characterisation of strains of infectious bronchitis virus isolated in Chile 5. *Avian Pathol* 20(1):85-99.
44. Cubillos A, Ulloa J, Cubillos V, Cook JK. 1991c. Characterisation of strains of infectious bronchitis virus isolated in Chile 5. *Avian Pathol* 20(1):85-99.
45. Darbyshire JH. (1985). A clearance test to assess protection in chickens vaccinated against avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathology*, 14, 497–508.
46. Davelaar F, Kouwenhoven B. 1977. Influence of maternal antibodies on vaccination of chicks of different ages against infectious bronchitis. *Avian Pathology* 6(1):41-50.
47. De Vries A, Horzingek M, Rottier P, de Groot R. 1977. The genome organization of Nidovirales: similarities and differences between arteri-toro and coronaviruses. *Seminars Virol* 8(1):33-47.
48. de Wit JJ, Boelm GJ, van Gerwe TJ, Swart WA. 2013. The required sample size in vaccination-challenge experiments with infectious bronchitis virus, a meta-analysis1. *Avian Pathol* 42(1):9-16.
49. de Wit J, Nieuwenhuisen-van Wilgen A, Hoogkamer Hi, vande Sande GJ, Zuidam R, Fabri T. Induction of cystic oviducts and protection against early challenge with infectious bronchitis virus serotype D388 (genotype QX) by maternally derived antibodies and

- by early vaccination. *Avian Pathology* 40, 463-471. 2011. Ref Type: Journal (Full)
50. de Witt J, van der Heijden H. Infectious bronchitis virus in Asia, Africa, Australia and Latin America: history, current situation and control measures. *Revista Brasileira de Ciencia Avicola* 12[2], 97-106. 2010. Ref Type: Journal (Full)
 51. de Witt J. 2000. Detection of Infectious Bronchitis Virus. *Avian Pathol* 29(2):71-93.
 52. de Witt S, Cook J, van der Heijden H. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathology* 40[3], 223-35. 2011. Ref Type: Journal (Full)
 53. Dhama K, Singh S, Barathidas R, Desingu P, Chakrabort S, Tiwari R. 2014. Emergence of Avian Infectious Bronchitis Virus and its variants need better diagnosis, prevention and control strategies: A Global perspective. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 17(6):751-67.
 54. Domingo E, Martinez-Salas E, Sobrino F, de la Torre JC, Portela A, Ortin J, LopezGalindez C, Perez-Brena P, Villanueva N, Najera R. 1985. The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance--a review 1. *Gene* 40(1):1-8.
 55. Dwars RM, Matthijs MG, Daemen AJ, van Eck JH, Vervelde L, Landman WJ. 2009. Progression of lesions in the respiratory tract of broilers after single infection with *Escherichia coli* compared to superinfection with *E. coli* after infection with infectious bronchitis virus 3. *Vet Immunol Immunopathol* 127(1-2):65-76.
 56. El-Houadfi M, Jones RC, Cook JK, Ambali AG. 1986. The isolation and characterisation of six avian infectious bronchitis viruses isolated in Morocco 1. *Avian Pathol* 15(1):93-105.
 57. Enjuanes L, Brian D, Cavanagh D, Holmes M, Lai H, Laude P, Masters P, Rottier P, Sideell W, Spaan F, Taguchi F, Talbot P. 2000. Coronaviridae. In: van Regenmortel M, Fauquet C, Bishop D, Carstens E, Ests M, Lemon S, Maniloff J, Mayo M, McGeogh D, Pringle C, Wickner R, editors. *Virus Taxonomy*. New York: Academic Press; p 835-49.
 58. Escorcía M, Jackwood MW, Lucio B, Petrone VM, Lopez C, Fehervari T, Tellez G. 2000. Characterization of Mexican strains of avian infectious bronchitis isolated during 1997 1. *Avian Dis* 44(4):944-7.
 59. Fabricant J. 1998. The early history of infectious bronchitis 1. *Avian Dis* 42(4):648-50.
 60. Fischer F, Stegen CF, Masters PS, Samsonoff WA. 1998. Analysis of constructed E gene mutants of mouse hepatitis virus confirms a pivotal role for E protein in coronavirus assembly 1. *J Virol* 72(10):7885-94.
 61. Gallardo RA, Hoerr FJ, Berry WD, van Santen VL, Toro H. 2011. Infectious bronchitis virus in testicles and venereal transmission 3. *Avian Dis* 55(2):255-8.
 62. Garwes DJ, Pocock DH. 1975. The polypeptide structure of transmissible gastroenteritis virus 5. *J Gen Virol* 29(1):25-34.
 63. Garwes DJ, Pocock DH, Pike BV. 1976. Isolation of subviral components from transmissible gastroenteritis virus 2. *J Gen Virol* 32(2):283-94.
 64. Gelb J, Jr., Ladman BS, Tamayo M, Gonzalez M, Sivanandan V. 2001. Novel infectious bronchitis virus S1 genotypes in Mexico 1998-1999 1. *Avian Dis* 45(4):1060-3.
 65. Godet M, L'Haridon R, Vautherot JF, Laude H. 1992. TGEV corona virus ORF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions 2. *Virology* 188(2):666-75.
 66. Guo Y, Tisoncik J, McReynolds S, Farzan M, Prabhakar BS, Gallagher T, Rong L, Caffrey M. 2009. Identification of a new region of SARS-CoV S protein critical for viral entry 1. *J Mol Biol* 394(4):600-5.

67. Han Z, Sun C, Yan B, Zhang X, Wang Y, Li C, Zhang Q, Ma Y, Shao Y, Liu Q, Kong X, Liu S. 2011. A 15-year analysis of molecular epidemiology of avian infectious bronchitis coronavirus in China 1. *Infect Genet Evol* 11(1):190-200.
68. Hesselink. 1991. Serotyping avian infectious bronchitis: selection of an unified method. 91; 89 p.
69. Hidalgo H, Gallardo R, Rosende S. 1976. Isolation of infectious bronchitis virus from broiler chickens in Chile 1. *Avian Dis* 20(3):601-3.
70. Hierholzer JC, Palmer EL, Whitfield SG, Kaye HS, Dowdle WR. 1972. Protein composition of coronavirus OC 43 2. *Virology* 48(2):516-27.
71. Hitchner S, Winterfield R, Appleton G. Infectious bronchitis types in teh United States. *Avian Disease* 10, 98-102. 1966. Ref Type: Journal (Full)
72. Hofstad MS. 1958. Antigenic differences among isolates of avian infectious bronchitis virus. *Am J Vet Res* 19(72):740-3.
73. Hogue B.G. 1995. Bovine coronavirus nucleocapsid protein processing and assembly. *Adv Exp Med Biol* 380:259-63.
74. Hogue B. M. 2008. Coronavirus structural sand virus assembly. *Nidoviruses*. S. G. Perlman, T; Snijdjer, E. Washington, ASM Press.
75. Hopkins SR, Yoder HW, Jr. 1984. Increased incidence of airsacculitis in broilers infected with mycoplasma synoviae and chicken-passaged infectious bronchitis vaccine virus 3. *Avian Dis* 28(2):386-96.
76. Hughes LA, Savage C, Naylor C, Bennett M, Chantrey J, Jones R. 2009. Genetically diverse coronaviruses in wild bird populations of northern England 3. *Emerg Infect Dis* 15(7):1091-4.
77. Ignjatovic J, Sapats S. 2000. Avian Infectious Bronchitis. *Revue scientifique et technique* (International Office of Epizootics):493-508.
78. Ignjatovic J, Galli L. 1993. Structural proteins of avian infectious bronchitis virus: role in immunity and protection 3. *Adv Exp Med Biol* 342:449-53.
79. Ignjatovic J, Galli L. 1994. The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens 1. *Arch Virol* 138(12):117-34.
80. Imbert I, Snijder EJ, Dimitrova M, Guillemot JC, Lecine P, Canard B. 2008. The SARS Coronavirus PLnc domain of nsp3 as a replication/transcription scaffolding protein1. *Virus Res* 133(2):136-48.
81. Jackwood MW. 2012. Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian Dis* 56(4):634-41.
82. Jackwood MW, Boynton TO, Hilt DA, McKinley ET, Kissinger JC, Paterson AH, Robertson J, Lemke C, McCall AW, Williams SM, Jackwood JW, Byrd LA. 2010a. Emergence of a group 3 coronavirus through recombination. *Virology* 398(1):98-108.
83. Jackwood MW, Hilt DA, Brown TP. 2003. Attenuation, safety, and efficacy of an infectious bronchitis virus GA98 serotype vaccine 1. *Avian Dis* 47(3):627-32.
84. Jackwood MW, Hilt DA, Lee CW, Kwon HM, Callison SA, Moore KM, Moscoso H, Sellers H, Thayer S. 2005. Data from 11 years of molecular typing infectious bronchitis virus field isolates 1. *Avian Dis* 49(4):614-8.
85. Jackwood M, de Witt S. 2013. Infectious Bronchitis. In: Swayne D, Glisson J, McDougald L, Nolan L, Suarez D, Nair V, editors. *Diseases of Poultry*. 13 ed. Ames: Wiley-Balckwell; p 139-59.

86. Johanson R, Marquardt W, Newman J. A new serotype of infectious bronchitis virus responsible for respiratory disease in Arkansas broiler flocks. *Avian Disease* 17, 518-523. 1973. Ref Type: Journal (Full)
87. Jones RC. 2010. Viral respiratory diseases (ILT, aMPV infections, IB): are they ever under control? 8. *Br Poult Sci* 51(1):1-11.
88. Jungherr EL, Chomiak, TW and Luginbuhl. 1956. Immunological differences in strains of infectious bronchitis virus. 203 p.
89. Kameka AM, Haddadi S, Kim DS, Cork SC, Abdul-Careem MF. 2014. Induction of innate immune response following infectious bronchitis corona virus infection in the respiratory tract of chickens 1. *Virology* 450-451:114-21.
90. Keeler C.L., Reed K.L., Nix W.A., Gelb J. (1998). Serotype identification of avian infectious bronchitis virus (IBV) by RT-PCR of the peplomer (S-1) gene. *Avian Dis.*, 42, 275–284.
91. Koch G, Hartog L, Kant A, van Roozelaar DJ. 1990. Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biological functions 1. *J Gen Virol* 71 (Pt 9):1929-35.
92. Koch G., Kant A., Cook J.K.A., Cavanagh D. 1992. Location of antigenic sites defined by neutralising monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolyptide. *J. Gen. Virol.*, 73, 591– 596.
93. Krapez U, Slavec B, Barlic-Maganja D, Rojs OZ. 2010. Molecular analysis of infectious bronchitis viruses isolated in Slovenia between 1990 and 2005: a retrospective study 5. *Virus Genes* 41(3):414-6.
94. Krapez U, Slavec B, Rojs OZ. 2011. Circulation of infectious bronchitis virus strains from Italy 02 and QX genotypes in Slovenia between 2007 and 2009 3. *Avian Dis* 55(1):155-61.
95. Kusters J.G., Niesters H.G.M., Lenstra J.A., Horzinek M.C., Van Der Zeijst B.A.M. 1989. Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV. *Virology*, 169, 217–221.
96. Ladman BS, Loupos AB, Gelb J, Jr. 2006. Infectious bronchitis virus S1 gene sequence comparison is a better predictor of challenge of immunity in chickens than serotyping by virus neutralization 6. *Avian Pathol* 35(2):127-33.
97. Lai M, Cavanagh D. The molecular biology of coronaviruses. *Adv.Vir.Res.* 48, 1-100. 1997. Ref Type: Journal (Full)
98. Lau SK, Li KS, Tsang AK, Lam CS, Ahmed S, Chen H, Chan KH, Woo PC, Yuen KY. 2013. Genetic characterization of Betacoronavirus lineage C viruses in bats reveals marked sequence divergence in the spike protein of pipistrellus bat coronavirus HKU5 in Japanese pipistrelle: implications for the origin of the novel Middle East respiratory syndrome coronavirus 2. *J Virol* 87(15):8638-50.
99. Lau SK, Li KS, Tsang AK, Shek CT, Wang M, Choi GK, Guo R, Wong BH, Poon RW, Lam CS, Wang SY, Fan RY, Chan KH, Zheng BJ, Woo PC, Yuen KY. 2012a. Recent transmission of a novel alphacoronavirus, bat coronavirus HKU10, from *Leschenault's rousettes* to *pomona* leaf-nosed bats: first evidence of interspecies transmission of coronavirus between bats of different suborders 3. *J Virol* 86(21):11906-18.
100. Lau SK, Woo PC, Yip CC, Fan RY, Huang Y, Wang M, Guo R, Lam CS, Tsang AK, Lai KK, Chan KH, Che XY, Zheng BJ, Yuen KY. 2012b. Isolation and characterization of a novel Betacoronavirus subgroup A coronavirus, rabbit coronavirus HKU14, from domestic rabbits 4. *J Virol* 86(10):5481-96.
101. Lee CW, Hilt DA, Jackwood MW. 2003. Typing of field isolates of infectious bronchitis virus based on the sequence of the hypervariable region in the S1 gene 1. *J Vet Diagn Invest* 15(4):344-8.

102. Lee CW, Jackwood MW. 2000. Evidence of genetic diversity generated by recombination among avian coronavirus IBV. *Arch Virol* 145(10):2135-48.
103. Lee EK, Jeon WJ, Lee YJ, Jeong OM, Choi JG, Kwon JH, Choi KS. 2008. Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus isolates in Korea between 2003 and 2006 4. *Avian Dis* 52(2):332-7.
104. Lim TH, Lee HJ, Lee DH, Lee YN, Park JK, Youn HN, Kim MS, Lee JB, Park SY, Choi IS, Song CS. 2011. An emerging recombinant cluster of nephropathogenic strains of avian infectious bronchitis virus in Korea 1. *Infect Genet Evol* 11(3):678-85.
105. Liu S, Chen J, Chen J, Kong X, Shao Y, Han Z, Feng L, Cai X, Gu S, Liu M. 2005. Isolation of avian infectious bronchitis coronavirus from domestic peafowl (*Pavo cristatus*) and teal (*Anas*) 1. *J Gen Virol* 86(Pt 3):719-25.
106. Liu SW, Zhang QX, Chen JD, Han ZX, Liu X, Feng L, Shao YH, Rong JG, Kong XG, Tong GZ. 2006. Genetic diversity of avian infectious bronchitis coronavirus strains isolated in China between 1995 and 2004 1. *Arch Virol* 151(6):1133-48.
107. Makino, S., J. O. Fleming, J. G. Keck, S. A. Stohlman and M. M. Lai 1987. "RNA recombination of coronaviruses: localization of neutralizing epitopes and neuropathogenic determinants on the carboxyl terminus of peplomers." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(18): 6567-6571.
108. Martins NR, Mockett AP, Barrett AD, Cook JK. 1991. IgM responses in chicken serum to live and inactivated infectious bronchitis virus vaccines 2. *Avian Dis* 35(3):470-5.
109. Martins NR, Mockett AP, Barrett AD, Cook JK. 1992. Local and systemic antibody class responses to an infectious laryngotracheitis virus vaccine strain 1. *Avian Pathol* 21(1):97106.
110. Mase M, Inoue T, Yamaguchi S, Imada T. 2008. Existence of avian infectious bronchitis virus with a European-prevalent 4/91 genotype in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 70: 1341-1344.
111. Matthijs MG, van Eck JH, Landman WJ, Stegeman JA. 2003. Ability of Massachusetts type infectious bronchitis virus to increase colibacillosis susceptibility in commercial broilers: a comparison between vaccine and virulent field virus 5. *Avian Pathol* 32(5):47381.
112. Meir R, Rosenblut E, Perl S, Kass N, Ayali G, Perk S, Hemsani E. 2004. Identification of a novel nephropathogenic infectious bronchitis virus in Israel. *Avian Dis.* 2004; 48: pp. 635641
113. Meulemans G, Boschmans M, Decaesstecker M, Berg TP, Denis P, Cavanagh D. 2001. Epidemiology of infectious bronchitis virus in Belgian broilers: a retrospective study, 1986 to 1995 1. *Avian Pathol* 30(4):411-21.
114. Mo M, Huang B, Wei P, Wei T, Chen Q, Wang X, Li M, Fan W. 2012. Complete genome sequences of two Chinese virulent avian coronavirus infectious bronchitis virus variants 3. *J Virol* 86(19):10903-4.
115. Mondal SP, Cardona CJ. 2007. Genotypic and phenotypic characterization of the California 99 (Cal99) variant of infectious bronchitis virus 1. *Virus Genes* 34(3):327-41.
116. OIE (World Organisation for animal Health). 2012. Paris, France. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. Chapter Avian infectious bronchitis. 7^a ed. (1): 421-422 [Internet]. Available from: <https://www.oie.int/doc/ged/D12008.PDF>.
117. OIE (World Organisation for animal Health). 2013. Avian Infectious Bronchitis. 1 p. Available from <https://www.oie.int/doc/ged/D12825.PDF>
118. Otsuki K, Huggins MB, Cook JK. 1990. Comparison of the susceptibility to avian infectious bronchitis virus infection of two inbred lines of white leghorn chickens 3. *Avian Pathol* 19(3):467-75.
119. Ovchinnikova EV, Bochkov YA, Shcherbakova LO, Nikonova ZB, Zinyakov NG, Elatkin NP, Mudrak NS, Borisov AV, Drygin VV. 2011. Molecular characterization of infectious bronchitis virus isolates from Russia and neighbouring countries: identification of intertypic recombination in the S1 gene 1. *Avian Pathol* 40(5):507-14.

120. Parthasarathy K, Lu H, Surya W, Vararattanavech A, Pervushin K, Torres J. 2012. Expression and purification of coronavirus envelope proteins using a modified beta-barrel construct 1. *Protein Expr Purif* 85(1):133-41.
121. Pei J, Briles WE, Collisson EW. 2003. Memory T cells protect chicks from acute infectious bronchitis virus infection 4. *Virology* 306(2):376-84.
122. Pocock D, Garwes D. 1977. The polypeptides of haemagglutinating encephalomyelitis virus and isolated subviral particles. *Archives of General Virology* 37:487-99.
123. Pratelli A. 2006. Genetic evolution of canine coronavirus and recent advances in prophylaxis 1. *Vet Res* 37(2):191-200.
124. Qian DH, Zhu GJ, Wu LZ, Hua GX. 2006. Isolation and characterization of a coronavirus from pigeons with pancreatitis 4. *Am J Vet Res* 67(9):1575-9.
125. Quiroz. 1993. Determinacion de la presencia del serotipo Arkansas a partir de aislamientos del virus de bronquitis infecciosa aviar en Mexico. 191 p.
126. Raggi LG, Lee GG. 1957. Relationship between immunity and serum-neutralization titers in chickens inoculated with three infectious bronchitis vaccines 5. *Am J Vet Res* 18(69):740-2.
127. Raggi LG, Lee GG. 1965. LACK OF CORRELATION BETWEEN INFECTIVITY, SEROLOGIC RESPONSE AND CHALLENGE RESULTS IN IMMUNIZATION WITH AN AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VACCINE 2. *J Immunol* 94:538-43.
128. Raj GD, Jones RC. 1997a. Cross-reactive cellular immune responses in chickens vaccinated with live infectious bronchitis virus vaccine 2. *Avian Pathol* 26(3):641-9.
129. Raj GD, Jones RC. 1997b. Infectious bronchitis virus: Immunopathogenesis of infection in the chicken 1. *Avian Pathol* 26(4):677-706.
130. Schalk A, Hawn M. An apparently new respiratory disease in baby chicks. *J Am Vet Med Ass* 78, 413-422. 1931. Ref Type: Journal (Full)
131. Schikora BM, Shih LM, Hietala SK. 2003. Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus California variants isolated between 1988 and 2001 based on the S1 subunit of the spike glycoprotein 2. *Arch Virol* 148(1):115-36.
132. Schultze B, Enjuanes L, Cavanagh D, Herrler G. 1993. N-acetylneuraminic acid plays a critical role for the haemagglutinating activity of avian infectious bronchitis virus and porcine transmissible gastroenteritis virus 1. *Adv Exp Med Biol* 342:305-10.
133. Seifi S, Asasi K, Mohammadi A. 2010. Natural co-infection caused by avian influenza H9 sybtype and infectious bronchitis viruses in broiler chicken farms 229. *Veterinarski Archiv* 2:269-81.
134. Seo SH, Pei J, Briles WE, Dzielawa J, Collisson EW. 2000. Adoptive transfer of infectious bronchitis virus primed alphabeta T cells bearing CD8 antigen protects chicks from acute infection 5. *Virology* 269(1):183-9.
135. Smith AR, Boursnell ME, Binns MM, Brown TD, Inglis SC. 1990. Identification of a new membrane-associated polypeptide specified by the coronavirus infectious bronchitis virus 1. *J Gen Virol* 71 (Pt 1):3-11.
136. Smith HW, Cook JK, Parsell ZE. 1985. The experimental infection of chickens with mixtures of infectious bronchitis virus and *Escherichia coli* 3. *J Gen Virol* 66 (Pt 4):77786.
137. Sturman LS, Holmes KV, Behnke J. 1980. Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid 2. *J Virol* 33(1):449-62.
138. Sudhir KJ, Hemlata J, Megha KB. 2016. Phylogenetic analysis of S1 gene of infectious bronchitis virus reveals emergence of new genotype. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*. IJAEB: 9(5): 719-723.

139. Sumi V, Singh SD, Dhama K, Gowthaman V, Barathidasan R, Sukumar K. 2012. Isolation and molecular characterization of infectious bronchitis virus from recent outbreaks in broiler flocks reveals emergence of novel strain in India 1. *Trop Anim Health Prod* 44(7):1791-5.
140. Thor SW, Hilt DA, Kissinger JC, Paterson AH, Jackwood MW. 2011. Recombination in avian gamma-coronavirus infectious bronchitis virus. *Viruses* 3(9):1777-99.
141. Timms LM, Bracewell CD. 1981. Cell mediated and humoral immune response of chickens to live infectious bronchitis vaccines 2. *Res Vet Sci* 31(2):182-9.
142. Timms LM, Bracewell CD. 1983. Cell mediated and humoral immune response of chickens to inactivated oil-emulsion infectious bronchitis vaccine 1. *Res Vet Sci* 34(2):224-30.
143. Timms LM, Bracewell CD, Alexander DJ. 1980. Cell mediated and humoral immune response in chickens infected with avian infectious bronchitis 3. *Br Vet J* 136(4):349-6.
144. Toro H, Hidalgo H, Cardoso W, Morales MA. 1990. Screening for antibodies against infectious bronchitis virus: specificity of the haemagglutination inhibition test 6. *Zentralbl Veterinarmed B* 37(4):254-6.
145. Toro H, van Santen VL, Jackwood MW. 2012. Genetic diversity and selection regulates evolution of infectious bronchitis virus 1. *Avian Dis* 56(3):449-55.
146. Tripet B, Howard MW, Jobling M, Holmes RK, Holmes KV, Hodges RS. 2004. Structural characterization of the SARS-coronavirus spike S fusion protein core 2. *J Biol Chem* 279(20):20836-49.
147. van Hemert MJ, van den Worm SH, Knoop K, Mommaas AM, Gorbalenya AE, Snijder EJ. 2008. SARS-coronavirus replication/transcription complexes are membrane-protected and need a host factor for activity in vitro 1. *PLoS Pathog* 4(5):e1000054.
148. Velayudhan BT, Shin HJ, Lopes VC, Hooper T, Halvorson DA, Nagaraja KV. 2003. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for the diagnosis of turkey coronavirus infection 37. *J Vet Diagn Invest* 15(6):592-6.
149. Villarreal LY, Sandri TL, Souza SP, Richtzenhain LJ, de Wit JJ, Brandao PE. 2010. Molecular epidemiology of avian infectious bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in breeders, broilers, and layers 2. *Avian Dis* 54(2):894-8.
150. Wakenell P. 1995. Infectious Bronchitis virus vaccines: Types and protection. *Infectious Bronchitis Workshop. Western Poultry disease conference. California USA.* pp 8,1-9.
151. Wakenell P, Sharma JM, Slocum RF. 1995. Embryo vaccination of chickens with infectious bronchitis virus: histologic and ultrastructural lesion response and immunologic response to vaccination 1. *Avian Dis* 39(4):752-65.
152. Wang X, Khan MI. 2000. Use of reverse transcriptase-polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism to examine the interaction between infectious bronchitis virus strains Massachusetts 41 and JMK in ovo 43. *Avian Pathol* 29(5):441-8.
153. Wang X, Rosa AJ, Oliverira HN, Rosa GJ, Guo X, Travnicek M, Girshick T. 2006. Transcriptome of local innate and adaptive immunity during early phase of infectious bronchitis viral infection 3. *Viral Immunol* 19(4):768-74.
154. Witter R. The diagnosis of infectious bronchitis of chickens by the agar gel precipitin test. *Avian Disease* 6, 478-492. 1962. Ref Type: Journal (Full)
155. Woo PC, Lau SK, Lam CS, Lau CC, Tsang AK, Lau JH, Bai R, Teng JL, Tsang CC, Wang M, Zheng BJ, Chan KH, Yuen KY. 2012. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus 5. *J Virol* 86(7):3995-4008.

156. Worthington KJ, Currie RJ, Jones RC. 2008a. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006 1. *Avian Pathol* 37(3):247-57.
157. Worthington KJ, Currie RJ, Jones RC. 2008b. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006 24. *Avian Pathol* 37(3):247-57.
158. You J, Reed M, Hiscox J. Trafficking motifs in the SARS-coronavirus nucleocapside protein. *Biochem Biophys Res Comm* 358[4], 1015-1020. 2007. Ref Type: Journal (Full)
159. Zhang Y, Wang HN, Wang T, Fan WQ, Zhang AY, Wei K, Tian GB, Yang X. 2010. Complete genome sequence and recombination analysis of infectious bronchitis virus attenuated vaccine strain H120 42. *Virus Genes* 41(3):377-88.
160. Zhou S, Tang M, Jiang Y, Chen X, Shen X, Li J, Dai Y, Zou J. 2014. Complete genome sequence of a novel infectious bronchitis virus strain circulating in China with a distinct S gene 2. *Virus Genes*
161. Ziegler AF, Ladman BS, Dunn PA, Schneider A, Davison S, Miller PG, Lu H, Weinstock D, Salem M, Eckroade RJ, Gelb J, Jr. 2002. Nephropathogenic infectious bronchitis in Pennsylvania chickens 1997-2000 1. *Avian Dis* 46(4):847-58.